

UNIVERSITE DE LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1964 - N° 506

TITRE DE LA THESE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'APPLICATION ANALYTIQUE
DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE.
COMPORTEMENT DE QUELQUES TYPES MOLECULAIRES
ISOLES OU EN MELANGE.

T H E S E

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON
le 16 Juin 1964

par

CHAPUY-SAVOINI Marie-Claire

Ex-Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Ex-Assistant au Laboratoire de Chimie Organique et Toxicologie
à la Faculté de Médecine et Pharmacie

Diplômée de Sérologie

Née le 25 Octobre 1936

à Roanne - Loire

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

N° 506

Contribution à l'étude de l'application
analytique de l'électrophorèse continue.

Comportement de quelques types moléculaires
isolés ou en mélange.

T H E S E

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie
de Lyon

le 16 Juin 1964

par Madame CHAPUY-SAVOINI Marie-Claire

Ex-Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Lyon
Ex-Assistant au Laboratoire de Chimie Organique
et Toxicologie à la Faculté de Médecine et
Pharmacie
Diplômée de Sérologie

Née le 25 Octobre 1936 à Roanne.

A MES PARENTS

En témoignage de ma profonde reconnaissance et
de ma plus tendre affection.

A MON MARI.

A MES BEAUX-PARENTS.

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur M. CHAMBON

Professeur de Chimie Organique et de Toxicologie

Officier de la Légion d'Honneur.

qui nous a guidé au cours de ce travail et nous a prodigué ses conseils précieux. Nous le prions d'agréer nos respectueux remerciements et l'expression de notre profonde reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554209_0024

A NOS JUGES

- Monsieur le Professeur J. DORCHE
Professeur de Matière médicale et
Législation pharmaceutique.
Biologiste des Hôpitaux.

Il nous a toujours réservé le meilleur des accueils. Ses conseils éclairés et ses encouragements ne nous ont jamais manqué. Qu'il veuille bien accepter le témoignage de toute notre gratitude.

- Monsieur le Professeur L. PERROT
Professeur de Chimie
Pharmacien-Chef des Hôpitaux.

Avec son affabilité coutumière, il nous a toujours témoigné beaucoup de sympathie.
Qu'il soit assuré de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement.

- Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS.

Qui a bien voulu juger ce travail.
Nous lui adressons nos respectueux remerciements.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE . . .
ET DE PHARMACIE DE LYON.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE LYON
=====

PERSONNEL DE LA FACULTE
=====

Doyens honoraires :

M. LEPINE J. : Membre de l'Institut.

M. HERMANN H. : Correspondant de l'Institut.

Doyen : J.-F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE,
MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

Professeurs

MM. CIBERT	Clinique urologique.
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique.
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale.
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie.
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B.
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B.
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires.
CROIZAT	Clinique médicale C.
ENSELME	Chimie biologique et médicale.
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A.
REVOL	Pharmacie galénique.
POLLOSSON	Clinique gynécologique.
PIGEAUD	Clinique obstétricale.
BOURRET	Médecine du Travail.
LEVRAT	Clinique médicale A.
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale.
NETIEN	Botanique et cryptogamie.
BERTRAND	Clinique chirurgicale C.
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique.
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie.
ROCHE	Médecine légale et déontologie.
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique.
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio- phonologie.
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique.
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie.
CREYSSEL	Chaire de clinique chirurgicale orthopédique et traumatologie.

.../...

DARGENT	Clinique carcinologique.
GUICHARD	Anatomie pathologique.
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale.
LATARJET	Anatomie.
PEYCELON	Pathologie chirurgicale.
GIRARD Marcel	Thérapeutique.
VACHON	Pathologie médicale.
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires.
PAPILLON	Radiologie.
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses.
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.
MONNET	Bactériologie.
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales.
CHATONNET	Physiologie B.
GUINET	Clinique endocrinologique.
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique.
FREIDEL	Clinique stomatologique.
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles.
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique.
DUMONT Louis	Histologie et embryologie.
PERROT	Chimie.
CIER J.-F.	Physiologie A.
PERRIN Jean	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque.
X.....	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge
X.....	Biologie médicale et pharmacodynamie.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine.
BERTOYE	Bactériologie.
MANSUY	Neuro-Chirurgie.
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique.
SARROUY	Clinique de pédiatrie.
LACROIX	Hygiène et clinique des maladies des pays chauds.
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique.
LECUIRE	Neuro-chirurgie.
REVOL	Médecine générale.
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale.
CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

ROMAN	Parasitologie.
FEROLDI	Anatomie pathologique.
MORET	Physique biologique.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSSEL Roger	Chimie biologique.
THIVOLET	Hygiène.
GARIN	Parasitologie.

PINET
 ODDOUX
 de SOLLIERS
 TOLOT
 DESPIERRES
 GUYOTAT
 DESCOTES
 JOUVET
 PEYRIN
 TOMMASI
 BUFFARD
 LEJEUNE
 de MOURGUES P.
 NAUSSAC
 REBOUILLAT
 ROMAGNY
 DELAHAYE J.P.
 DELEUZE
 GIRAUD
 MICHEL
 FRANCOIS
 MICHOUILLER
 COLOMB
 LAMBERT
 FRIES
 GILLY

Electro-radiologie.
 Botanique et cryptogamie.
 Chimie analytique.
 Médecine du travail.
 Médecine générale.
 Neuro-psychiatrie.
 Chirurgie générale.
 Pathologie expérimentale.
 Physique biologique.
 Anatomie pathologique.
 Electro-radiologie.
 Médecine générale et thérapeutique.
 Stomatologie.
 Maladies infectieuses.
 Chirurgie générale.
 Pédiatrie.
 Médecine générale.
 Anesthésiologie.
 Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique.
 Anesthésiologie.
 Pédiatrie et puériculture.
 Chirurgie générale.
 Dermatologie.
 Médecine générale.
 Médecine générale.
 Pédiatrie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. DUROUX
 BRETTE
 BOUCHET
 FAVRE-GILLY
 GIROD
 GRAS
 MALLEIN
 RIFFAT
 FAUCON
 FLANDROIS
 VIALLIER-RAYNARD

Anatomie.
 Thérapeutique.
 Anatomie.
 Hématologie.
 Histologie et embryologie.
 Chimie biologique.
 Chimie analytique.
 Hygiène.
 Biologie médicale et pharmacodynamie.
 Physiologie.
 Bactériologie.

AGREGES EN EXERCICE

BURTHIAULT
 GIGNOUX
 GUILLEMIN
 JAUBERT de BEAUJEU
 MARION Pierre
 PLAUCHU
 PONT
 SAUTOT
 TRAEGER
 VIGNON
 BONAMOUR

Obstétrique.
 Oto-rhino-laryngologie.
 Chirurgie générale.
 Chirurgie générale.
 Chirurgie générale.
 Médecine générale.
 Médecine générale.
 Chirurgie générale.
 Médecine générale.
 Médecine générale.
 Ophtalmologie.

COLIN	Médecine légale.
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale.
DEVIC	Médecine générale.
DUMONT Martial	Obstétrique.
DURAND	Urologie.
FRANCILLON	Chirurgie générale.
SAUBIER	Chirurgie générale.
SCHOTT	Neuro-psychiatrie.
ALLEGRE	Neuro-chirurgie.
CHASSARD	Electro-radiologie.
FAYSSE	Orthopédie.
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie.
GARDE	Médecine générale.
HUGONNIER	Ophtalmologie.
KALB	Pneumo-phitisiologie.
LARBRE	Médecine générale.
MARET	Chirurgie générale.
MORNEX	Médecine générale.
NORMAND	Médecine générale.
PERRIN André	Médecine générale.
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture.
DUMAS	Stomatologie.
GARMIER	Obstétrique.
NOEL	Médecine générale.
ROBERT	Médecine générale.
SCHNEPP	Orthopédie.

EXAMINATEURS DE LA THESE :

MM. CHAMBON, Président ; DORCHE, PERROT, GRAS.

INTRODUCTION

Parmi les méthodes modernes d'analyse l'électrophorèse a pris une grande place surtout en biologie s'appliquant à la séparation de molécules lourdes, notamment dans le domaine des protéines plus ou moins associées et des acides aminés, mais aussi en toxicologie pour la séparation de quelques molécules plus simples comme les alcaloïdes.

Plus récente est l'apparition de l'électrophorèse continue dont le but peut être non seulement la séparation pour identification et dosage, mais aussi la "préparation", c'est-à-dire une séparation théorique des constituants mobiles dans le champ électrique, et leur collecte en quantité nettement plus considérable au gré de l'alimentation continue.

Si les publications concernant les séparations préparatives de diverses fractions protéiques et enzymatiques sont nombreuses, très peu de travaux ont été diffusés sur l'application de cette méthode à la définition de mélanges de molécules beaucoup plus simples, salines par exemple, tels qu'ils peuvent se présenter dans des préparations pharmaceutiques ou d'usage courant. Aussi nous a-t-il paru intéressant de nous attacher à étudier dans un but analytique, le comportement de quelques molécules simples et complexes, isolées ou en mélanges.

Nous avons ordonné la présentation de notre travail suivant le plan suivant :

Première partie.

- I - Généralités sur l'électrophorèse continue. Rappel des travaux antérieurs.
- II - Aperçus sur la constitution des complexes et des chélates.

Deuxième partie. Travaux personnels.

- I - Adaptation de l'appareil à électrophorèse.
- II - Etude de l'électrophorèse continue de sels simples :
 - Acétate de Cobalt,
 - Sulfate de Cuivre.
- III - Etude de l'électrophorèse continue d'un mélange complexe : l'Antimoniotatrate acide de Potassium.
- IV - Etude de l'électrophorèse continue de chélates de l'acide éthylène diamine tétra-acétique :
 - chélate de calcium,
 - chélate de cuivre.
- V - Etude de l'électrophorèse continue des complexes cobaltiques :
 - de la Cyanocobalamine,
 - de l'hydroxocobalamine,
 - des mélanges de cyano et hydroxocobalamine.
- VI - Etude de l'électrophorèse continue d'Alcaloïdes :
 - Atropine-Strychnine
 - Morphine-Cocaïne.
- VII - Etude de l'électrophorèse continue du mélange médicamenteux : salicylate de Sodium, glucose, Héxaméthylène tetramine.

Troisième partie.

Discussion.

Conclusion.

Bibliographie.

o
o o

.../...

Première Partie

I - GENERALITES ET TRAVAUX ANTERIEURS

Principe :

Qu'est-ce que l'électrophorèse ? On entend par électrophorèse le déplacement dans un champ électrique d'une molécule organique ionisée. Elle se différencie de l'électrolyse, en ce sens qu'on n'observe aucun dépôt, ni aucune réaction chimique au niveau des électrodes. On assiste simplement à une migration en direction de l'électrode de charge opposée. Lorsqu'il s'agit de composés minéraux on parle d'~~Ion~~ophorèse.

Différentes sortes d'électrophorèse : (21)

La migration se fait généralement dans une solution aqueuse tamponnée, soit en milieu liquide, c'est l'électrophorèse libre, soit sur un support (papier, gels divers) imprégné de la solution, c'est l'électrophorèse de zone.

I - Electrophorèse libre

Tiselius(78-79) en 1930 réalise la première électrophorèse. La solution à analyser est introduite dans un tube en U. A chaque extrémité du tube est appliquée une différence de potentiel. Les évaluations qualitatives et quantitatives sont effectuées le plus souvent par réfractométrie.

II - Electrophorèse de zone ou électrophorèse sur papier.

Schématiquement l'appareillage se réduit à deux bacs contenant le tampon dans lequel baignent les électrodes. La bande de papier imprégné de tampon plonge dans chacun des deux bacs et est maintenue tendue horizontalement par un dispositif approprié. La substance à analyser est déposée en tache ou en ligne, de préférence quantitativement. L'endroit du dépôt est fonction de la charge de la substance à analyser dans les conditions expérimentales.

III - Electrophorèse continue

Les premières investigations pour définir les principes de l'électrophorèse continue sont dues à HAUGAARD et KRONER (1948). (33)

En 1949 et en 1950 presque en même temps et indépendamment GRASSMAN (23) SWENSON et BRATTSTEN (77) établissent le même principe.

La migration des particules s'effectue sur une feuille de papier sensiblement carrée, maintenue verticalement. Les deux côtés latéraux sont en relation avec les électrodes, un courant de tampon s'écoule de haut en bas.

Ainsi la substance à analyser se trouve soumise à deux forces, - F - et - F₁ - qui sont perpendiculaires l'une à l'autre. La première force F est constituée par le flux d'électrolytes qui descend par gravité le long de la feuille de papier, c'est une force hydrodynamique, la deuxième force F₁ est une force électrique, elle crée un champ horizontal.

La force F est identique pour toutes les particules alors que la force électrique F_1 est variable suivant la charge et la mobilité de celles-ci.

Pour une particule donnée simple la direction sera déterminée par la résultante des forces F et F_1 .

Définition des différentes électrophorèses continues.

a) "Collecting électrophorèse" ou électrophorèse de préparation.

Si l'échantillon à analyser est appliqué de façon continue on peut de même collecter les fractions séparées de façon continue. Le but de cette électrophorèse est la récupération des fractions isolées.

b) "Star électrophorèse" ou électrophorèse en spot.

Si l'échantillon est appliqué en une seule fois en un endroit déterminé il se fractionne en une série de spots plus ou moins dispersés. Cette méthode est appelée "star électrophorèse" ou électrophorèse en étoile, par suite de l'aspect de la feuille de papier après révélation des différentes taches.

c) Quels sont les avantages de ces deux types d'électrophorèse l'un par rapport à l'autre ?

Contrairement à l'électrophorèse de zone, unidimensionnelle, il n'y a pas de contamination entre les fractions isolées ; chacune d'elle migre en direction d'un point qui lui est propre.

En général la migration des particules sur un support est gênée par l'adsorption. Dans le cas de l'électrophorèse continue dite de préparation l'échantillon à analyser est amené sur la feuille d'une façon continue, l'adsorption interviendra seulement sur le temps que les particules mettront pour atteindre le bas de la feuille. Il apparaît donc qu'on ne pourra séparer, par cette méthode, que des fractions ayant des mobilités électrophorétiques différentes. Dans le cas de l'électrophorèse en spot, deux composants ayant la même mobilité mais une adsorption différente, apparaîtront sous forme de deux taches isolées situées sur la même droite à partir du spot original. Il est évident que seules les substances ayant même mobilité et même adsorption ne pourront pas être séparées.

Quels sont les problèmes que pose l'électrophorèse continue ?

L'interférence du champ électrique, et du flux d'électrolyte donne naissance à plusieurs problèmes.

1) Problèmes hydrodynamiques du champ vertical.

Dans le sens vertical, par suite de l'évaporation due à l'effet JOULE, il y a ralentissement de l'alimentation en électrolyte dans la partie inférieure de la feuille de papier. Dans le sens horizontal, il y a assèchement au voisinage des électrodes et par conséquent déséquilibre de l'hydratation le long de la feuille.

En conséquence logique de l'évaporation, il y a concentration de l'électrolyte ce qui entraîne une perturbation de champ électrique, qui à son tour aggrave le phénomène d'évaporation.

Il sera donc nécessaire, avant chaque expérience, de prévoir un délai d'écoulement de la solution d'électrolyte pour réaliser l'équilibre hydrodynamique avant l'introduction de la substance à séparer.

2) Problèmes du champ électrique.

Il est difficile d'appliquer des électrodes sur un support. Les conditions qui permettent d'obtenir un champ électrique homogène et d'éliminer les produits d'électrolyse sont paradoxalement contradictoires. Si on applique le courant aux angles inférieurs de la feuille, il y a distorsion complète du champ ; si on l'applique le long des bords verticaux, le champ est plus régulier mais des variations importantes de pH se manifestent dans cette zone, elles sont dues à l'électrolyse de la solution du tampon.

Il est nécessaire de maintenir une concentration ionique à peu près constante pour ne pas faire varier la mobilité des particules au cours d'une expérience (59-60).

Conditions expérimentales.

Quelques principes sont essentiels dans l'étude de cette électrophorèse (4-6)

1) Appareil :

a) Les électrodes.

Deux types d'électrodes ont été suggérés :

- électrodes extérieures.

Leur principe est dû à DURRUM (16). Elles sont simplement constituées par des bacs à électrolytes dans lesquels plongent les angles inférieurs de la feuille nous en avons vu plus haut les inconvénients. DI CASTRO et SAN MARCO (13) ont apporté une amélioration à ce principe. Il faut noter cependant que de telles électrodes sont d'une réalisation difficile.

- électrodes latérales.

Le procédé qui donne le champ électrique le plus régulier est celui qui utilise les électrodes latérales. Il apparaît cependant une distorsion dans la partie supérieure du champ due au shunt causé par le bac à électrolyte central (24). L'élimination des produits d'électrolyse est difficile.

On peut réaliser des électrodes latérales de deux façons :

- soit à l'aide d'une membrane semi-perméable plaquée contre la feuille dans laquelle passe un fil de platine et où le tampon est régulièrement amené et éliminé après électrolyse (71).

- soit à l'aide d'une succession de petits bacs à électrolytes situés le long des bords verticaux de la feuille. Un fil de platine court en zig-zag d'un récipient à l'autre. Ce procédé est appelé "électrode en cascade" (35).

b) Alimentation de la feuille en électrolyte.

L'importance du problème de l'alimentation en électrolyte est due à son aspect hydrodynamique et à ses effets sur le champ électrique. Plusieurs méthodes pour régulariser l'écoulement sont valables. On peut agir sur :

- la feuille. On peut utiliser des papiers filtres d'épaisseur et de porosité variables. Les papiers grossiers et épais donnent un écoulement plus rapide et des séparations moins bonnes que les papiers plus minces et plus compactes.

- la hauteur du niveau de l'électrolyte dans le réservoir dans lequel plonge la feuille.

- l'aspect du rebord de la feuille qui plonge dans le réservoir. Si on découpe ce rebord en dents de scie, l'écoulement sera ralenti plus ou moins suivant la profondeur à laquelle plongeront les languettes.

- la viscosité de l'électrolyte. On ajoute un matériel inerte à l'électrolyte pour accroître sa viscosité dans le but double de réduire la quantité de liquide et pour augmenter la permanence de l'imbibition de la feuille. Ainsi la glycérine et le propylène glycol ont été utilisés dans les séparations de protéines (DURRUM en 1951). Ces deux corps à des concentrations de l'ordre de 10 à 20 % sont pratiquement sans effets sur le pH de beaucoup d'électrolytes. Lorsqu'on utilise ces substances, on a un autre avantage : la pression de vapeur de l'électrolyte est réduite et ainsi l'évaporation est moins importante.

- Une modification pratique permet de contrôler localement l'humidité : elle consiste à superposer en un point des épaisseurs de papier filtre (le long des électrodes par exemple).

c) L'évaporation.

En principe pour un flux d'électrolyte donné, plus l'intensité du champ électrique sera forte, meilleure sera la séparation des fractions : si U_A et U_B représentent les mobilités de A et de B, si X est la force du champ électrique, et si T est le temps, la séparation des zones est donnée par l'équation :

$$d_A - d_B = (U_A - U_B) X.T$$

Or étant donné la formule de JOULE :

$$JQ = RI^2T$$

plus I sera grand, plus JQ sera important et plus l'évaporation sera forte.

Pour la séparation de substances thermolabiles (protéines par exemple) il est désirable d'employer des courants de faible intensité pour permettre des séparations à basse température. Cet échauffement est particulièrement gênant lorsqu'on utilise des électrolytes non volatils, il peut y avoir évaporation extrême et concentration de l'électrolyte allant jusqu'à la cristallisation de ce dernier. Dans certains cas il y a dépôt solide de la substance à séparer. Néanmoins il est parfois désirable d'utiliser un courant électrique à peine inférieur à celui qui provoque le dépôt solide de la substance à analyser ; on recueille ainsi des fractions en solution plus concentrée. Il est bien entendu que ceci n'est valable que pour les substances thermostables.

Lorsqu'on utilise des électrolytes volatils, l'intensité électrique pourra être plus importante puisqu'il n'y a pas de risques de cristallisation.

Il est possible de freiner l'évaporation en agissant sur la cuve à électrophorèse elle-même et sur son air ambiant.

Une cuve petite a son atmosphère plus rapidement saturée ; aussi place-t-on à l'extérieur de celle-ci le maximum d'accessoires. On pourrait freiner l'évaporation en évitant la condensation des vapeurs sur les parois froides de la cuve en utilisant par exemple, des parois en plastique plus minces. On peut aussi employer des housses en matière plastique souple et transparente (facilité de manipulation) qui permettent d'obtenir une pression de vapeur plus élevée pour la solution d'électrolyte (62).

L'importance du refroidissement a été signalée. On peut éliminer le dégagement de chaleur à l'aide d'un réfrigérant liquide ou gazeux passant à l'intérieur du cadre qui supporte la feuille de papier. On adopte soit une circulation d'eau froide (35-68), soit l'air conditionné. (31).

Quelques auteurs pour prévenir l'évaporation pincent la feuille de papier entre deux plaques de verre (17). STAIN en 1951 (74) et SWENSSON (78) ont obtenu de bonnes séparations en utilisant ce système.

e) Le support.

En règle générale, comme nous l'avons vu précédemment, les papiers grossiers et épais donnent un flux plus rapide, une moins bonne séparation des fractions et une évaporation plus intense que les papiers minces et compacts..

D'autres supports tels que :

- poudre de verre (25),

- poudre de cellulose (14), ont été proposés mais ils n'ont pas encore reçu d'application.

d) L'électrolyte. (2)

Il est important de noter que de larges différences de mobilité des ions permettent des séparations plus rapides et plus faciles : Nous avons vu précédemment la formule donnant la séparation de deux ions A et B.

Au cours d'une migration électrophorétique la mobilité croît tandis que décroît la force ionique du tampon. La force ionique est définie (45) comme étant égale à la demi-somme étendue à tous les ions de la solution des produits $C_i Z_i^2$, C_i étant la concentration et Z_i la valence de l'ion d'espèce "i".

$$\mu = \frac{I}{2} C_i Z_i^2 = \frac{I}{2} (C_{i1} Z_{i1}^2 + C_{i2} Z_{i2}^2 + \dots \text{etc}).$$

Force ionique et intensité du champ électrique varient en sens inverse :

$$\text{Intensité du champ} = \frac{I}{q_s \times K_s}$$

I représente le courant en Ampères, q_s la section droite "s" et K_s la conductibilité spécifique en Mhos/cm au niveau "s" de la section "s".

Il est nécessaire de définir en pratique une composition correcte de l'électrolyte pour chaque expérience. Pour les séparations continues on utilise en principe des solutions de force ionique faible, au contraire pour l'électrophorèse en spot on emploie des solutions de force ionique élevée qui donnent des séparations plus nettes.

2) Fonctionnement de l'appareil.

a) Electrophorèse de collecte ou de préparation.

Le but de cette méthode est l'isolement quantitatif de chaque fraction. Les fractions collectées peuvent être concentrées :

Il est dialysé avec une solution de Dextran

- soit par ultra-filtration.
- soit à l'aide d'un gel séchant (pour les substances autres que les protéines)
- soit en déplaçant l'électrolyte par évaporation (à condition que les composants soient volatils et que les fractions soient suffisamment stables).

Les protéines du sérum, (26), le collagène (27), et l'insuline (28) ont été étudiés de cette façon.

Un problème particulier à l'électrophorèse de collecte est le mode d'application de la substance à séparer sur le support. Plusieurs méthodes ont été utilisées. La solution à fractionner étant dans un récipient, la liaison entre celui-ci et la feuille de papier peut être faite à l'aide :

- d'une languette de papier : ce mode d'alimentation est irrégulier et incontrôlable en cours d'opération.
- d'une petite mèche de coton : de cette façon l'alimentation est meilleure qu'en utilisant la languette de papier, mais il y a danger d'assèchement.
- d'un capillaire de verre ou de plastique : ces derniers ont tendance à s'encrasser ou à être bloqués par une bulle d'air.

Rappelons ici qu'il est nécessaire de prévoir un temps de latence avant d'introduire l'échantillon à analyser sur la feuille de papier afin que les différentes forces électriques et hydrodynamiques aient le temps de s'équilibrer.

b) Electrophorèse en spot ou "star électrophorèse".

En principe le but de cette méthode est la séparation qualitative et rapide des fractions. Elle n'exclue cependant pas les séparations quantitatives.

Appareillage et technique d'utilisation sont identiques dans les deux méthodes, à part quelques détails. Ainsi l'échantillon est appliqué en une seule fois sur la feuille de papier, et son volume est réduit : 0,010 à 0,020 ml. L'application est faite à l'aide d'une micropipette ou avec un petit disque de papier imprégné de la solution. La zone d'application est séchée superficiellement pour éviter la diffusion.

Après l'expérience, il est important de sécher rapidement la feuille surtout si l'on désire éluer les spots pour une estimation quantitative des fractions.

Le principal avantage de cette méthode est la possibilité d'appliquer l'électrophorèse bidimensionnelle à de micro-échantillons. De plus comme nous l'avons déjà signalé, elle permet la séparation des fractions ayant même mobilité électrophorétique mais un degré d'adsorption différent.

Cette électrophorèse en spot a reçu de nombreuses applications, en particulier dans le domaine de la pédiatrie. Elle a été utilisée pour l'analyse des protéines du sérum et la séparation d'ions métalliques par STRAIN en 1951 (75-76).

CONCLUSIONS.

Les techniques électrophorétiques bidimensionnelles, que ce soit la méthode continue, et peut-être plus encore la méthode en spot, ont un grand intérêt dans les travaux de laboratoire clinique (67). Des appareillages modernes permettent actuellement d'effectuer des séparations dans des conditions de travail aisées. Elles ont rendu de grands services là où avait échoué l'électrophorèse unidimensionnelle.

II - APERÇUS SUR LA CONSTITUTION DES COMPLEXES ET DES CHELATES

Au commencement de ce siècle les ions complexes en solution représentaient une complication gênante dans le cadre de la théorie d'ARRHENIUS (64-81).

La notion actuelle d'ion complexe est l'aboutissement d'une longue série de recherches et de discussions sur la nature des sels. (57)

Dissimulation des atomes dans les ions complexes.

Le radical complexe type présente un ensemble de propriétés chimiques qui lui est propre et qui l'on fait justement comparer à un élément véritable. L'Ammonium (NH_4^+) ne rappelle par ses propriétés ni l'Azote ni l'Hydrogène. Il ne se comporte en rien comme un métalloïde mais plutôt comme un métal. En fait l'Ammonium est un ion positif aussi analogue que possible par ses propriétés aux autres cations.

On exprime les faits de ce genre en disant que les propriétés des atomes sont dissimulées dans les radicaux. En solution les ions du Cobalt présentent des réactions caractéristiques, celles-ci ne se manifestent plus si le Cobalt est engagé dans un complexe, cobaltamine par exemple.

Définition des complexes parfaits, imparfaits et des sels doubles.

On désigne sous le nom de complexes parfaits ceux dans lesquels les atomes de métaux sont franchement dissimulés à leurs réactifs habituels lorsqu'on les met en solution. Dans nombre de complexes cette dissimulation cesse d'être appréciable, on leur donne alors le nom de sels doubles.

Il y a une différence essentielle entre les complexes parfaits et les sels doubles. En solution le sel double est décomposé et les ions des sels simples se manifestent à leurs réactifs habituels. Dans les complexes parfaits l'action du dissolvant se limite à la dissociation de la molécule en deux ions qui ne perdent rien de leur complexité ; les métaux lourds demeurent masqués aux réactifs qui les décelent à l'état d'ions simples.

Exemples :

- complexe parfait : nitroprussiate de sodium $\text{Na}_2 \text{Fe} (\text{CN})_5 \text{NO}$

- sel double : Alumine $(\text{SO}_4)_3 \text{Al}_2, 3\text{O}_4 \text{K}_2, 24 \text{H}_2\text{O}$

si la différence entre ces extrêmes est bien tranchée, si analytiquement le complexe parfait se distingue nettement de sel double, il existe entre ces deux classes de corps toutes les transitions possibles.

Un très grand nombre de sels complexes se comportent vis-à-vis de certains réactifs comme le feraient des complexes parfaits et vis-à-vis d'autres réactifs comme le feraient des sels doubles. On désigne ces corps de transition sous le nom de complexes imparfaits.

Exemple :

- Ferripyrophosphate de sodium $\text{Na}_6 \text{Fe}_2 (\text{P}_2\text{O}_7)_3, 9 \text{H}_2\text{O}$.

Il existe de nombreuses méthodes physiques et chimiques susceptibles de renseigner sur l'état de dissimulation des atomes et des groupes d'atomes dans les complexes.

Indice de coordination.

En 1891 WERNER (82) a proposé sa théorie de la Coordination. C'est une théorie ionique elle concerne seulement les complexes issus de réactions entre les ions et les molécules présents en solution.

Certains atomes se combinent avec un nombre défini maximum d'autres ions, molécules ou radicaux. Ce nombre est appelé nombre ou indice de coordination. Cet indice est égal à 2 avec les ions coordinateurs monovalents comme l'Argent et le Cuivre ; il est égal à 4 avec les ions bivalents comme le Cuivre, le Mercure mais non avec ceux qui peuvent être trivalents comme le Fer et le Cobalt ; il est égal à 6 avec les ions trivalents comme le Cobalt, le Fer et aussi avec leur forme divalente, ainsi qu'avec les ions tétravalents comme le Platine ; le Plomb, l'Etain ; enfin il est égal à 8 avec les métaux lourds comme le Thallium, le Molybdène.

La coordinance n'a pas de rapport simple avec la valence de l'ion coordinateur.

Apports ultérieurs à la théorie de WERNER. (42-49-57)

Les progrès de la technique et de la théorie ont fourni la confirmation et permis l'extension de la systématique de Werner au moins dans ce qu'elle a d'essentiel. Ses schémas représentatifs ont été retrouvés par l'analyse des cristaux aux rayons X, et les notions empiriques de coordination ont reçu leur véritable signification de la théorie électronique de la valence. Les mécanismes valentiels intervenant dans la structure des complexes de coordination sont encore, en fait, relativement mal connus. Depuis quelques années on cherche à perfectionner les théories déjà anciennes qui ont suivi les progrès que Werner avait apporté dans ce domaine ; on se préoccupe surtout du rôle que jouent les groupes coordonnés ou ligants autour de l'atome central. La théorie classique de la covalence de Pauling (72) n'est pas toujours suffisante pour tout expliquer. Les attractions électrostatiques jouent probablement un rôle important. Une certitude demeure c'est l'éminente facilité avec laquelle les éléments de transition fournissent les complexes de coordination les plus divers avec les ligants organiques comme avec les ligants minéraux (50).

Pour les métaux on interprète la formation de complexes comme leur tendance à combler les orbitales inoccupées et à essayer d'approcher la configuration des gaz rares.

SCHWARZENBACH (69) a proposé une classification des complexes. Il classe les métaux en trois groupes :

- groupe A : cations à configuration des gaz rares.
- groupe B : cations à couche D incomplète.
- groupe C : métaux de transition avec des sous-couches incomplètes.

CHELATES

Quand deux atomes voisins (ou pouvant le devenir par le jeu de la rotation autour des liaisons simples) sont, l'un pourvu d'un doublet solitaire, l'autre entouré d'une couche électronique incomplète, un lien de coordination peut s'instaurer entre eux, (éventuellement rendu moins fort par l'intervention de tensions internes). La molécule se referme sur elle-même.

Ce type de formation a été nommé "chélate" par MORGAN et DREW (51). Un chélate peut être représenté de la façon suivante : (49)

- si M représente le métal, A-A l'agent chélateur, - le lien de covalence, et $\curvearrowright$ le lien de coordination, on écrit :



.../...

LEY en 1904 (43) a été le premier à reconnaître la signification spéciale des composés complexes de structure cyclique.

DIEHL a classé les chélates suivant le nombre total de groupes donneurs de l'agent complexant et le nombre relatif des groupes coordonnants et acides compris dans la formation cyclique.

Les agents de chélation convenables sont les molécules qui contiennent à la fois l'Oxygène et l'Azote comme atomes donneurs d'électrons.

SCHWARZENBACH a montré pourquoi l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique ou E-D-T-A donne des complexes si extraordinairement stables. Il a aussi montré que les possibilités de synthétiser des agents de chélation plus puissants étaient limitées (70).

Les complexes de l'acide diamino-cyclohexane tetra-acétique ont des constantes de stabilité légèrement plus élevées que les complexes formés par l'E-D-T-A ; mais ceci ne peut pas suggérer beaucoup de nouveaux types d'agents de chélation. Il existe une possibilité intéressante d'accroître la stabilité de l'E-D-T-A en introduisant des groupes NCH_3 et S dans la chaîne. De tels agents donnent des complexes remarquablement stables avec les métaux du groupe B de la classification de Schwarzenbach.

Importance des chélates.

L'utilisation des chélates métalliques dans diverses branches de la chimie théorique et appliquée, et dans les branches voisines, est maintenant reconnue. Les réactifs qui donnent les chélates métalliques sont utilisés de plus en plus en analyse qualitative et quantitative.

En physiologie les sels d'amino-acides des métaux lourds, les séries médicamenteuses du pyrocathéchol sont une illustration faible de l'emploi des chélates. Les pigments chélates, tels que la phtalocyanine sont utilisés largement.

Un certain nombre d'acides amino-polycarboxyliques ont la propriété de donner des chélates solubles dans l'eau, ils sont devenus d'usage largement étendu. Ces substances intéressantes dont les plus importantes sont les sels alcalins de l'E-D-T-A et des phosphates condensés sont fabriquées en grande quantité et utilisées quand le déplacement d'ions métalliques est désirable : adoucissement de l'eau, inhibition de la catalyse, clarification des solutions, traitement des intoxications par les métaux lourds.

o

o o

Deuxième Partie

TRAVAUX PERSONNELS

I - ADAPTATION DE L'APPAREIL A ELECTROPHORESE

A - Description de l'appareil

Pour toutes nos expériences, nous avons utilisé l'appareil à électrophorèse continue N° 2520 et le générateur de courant continu fabriqué par la SHANDON SCIENTIFIC COMPANY LTD (London). (Schéma n° 1).

1° Cuve à électrophorèse.

Elle est entièrement construite en perspex. Ses dimensions sont les suivantes :

- longueur 530 mm
- épaisseur 325 mm
- hauteur 680 mm

A l'extérieur on place le maximum d'accessoires. A la partie supérieure la cuve est pourvue d'un rebord de verre sur lequel sont placées trois bouteilles d'une contenance de deux litres ; deux de celles-ci servent à alimenter les électrodes et celle du milieu la cuve où plonge le support. A la base se trouvent les bacs à électrolyte dans lesquels se déversent les produits d'électrolyse des électrodes et le trop-plein de la cuve d'alimentation du support.

A l'intérieur on place la cuve à électrolyte dans laquelle plonge le support. Elle est pourvue d'un trop-plein de hauteur réglable et d'une plate-forme glissante adaptée à son rebord qui supporte le petit réservoir de verre dans lequel on place la substance à analyser. A la partie inférieure dans un casier dont on dispose les tubes destinés à recueillir les fractions séparées.

Toute cette partie intérieure de la cuve est fermée par un panneau détachable et mobile. Le déplacement de ce panneau entraîne un mécanisme qui déconnecte immédiatement l'apport électrique.

2° Electrodes.

Nous utiliserons les électrodes latérales qui apportent comme nous l'avons déjà signalé un champ électrique plus uniforme.

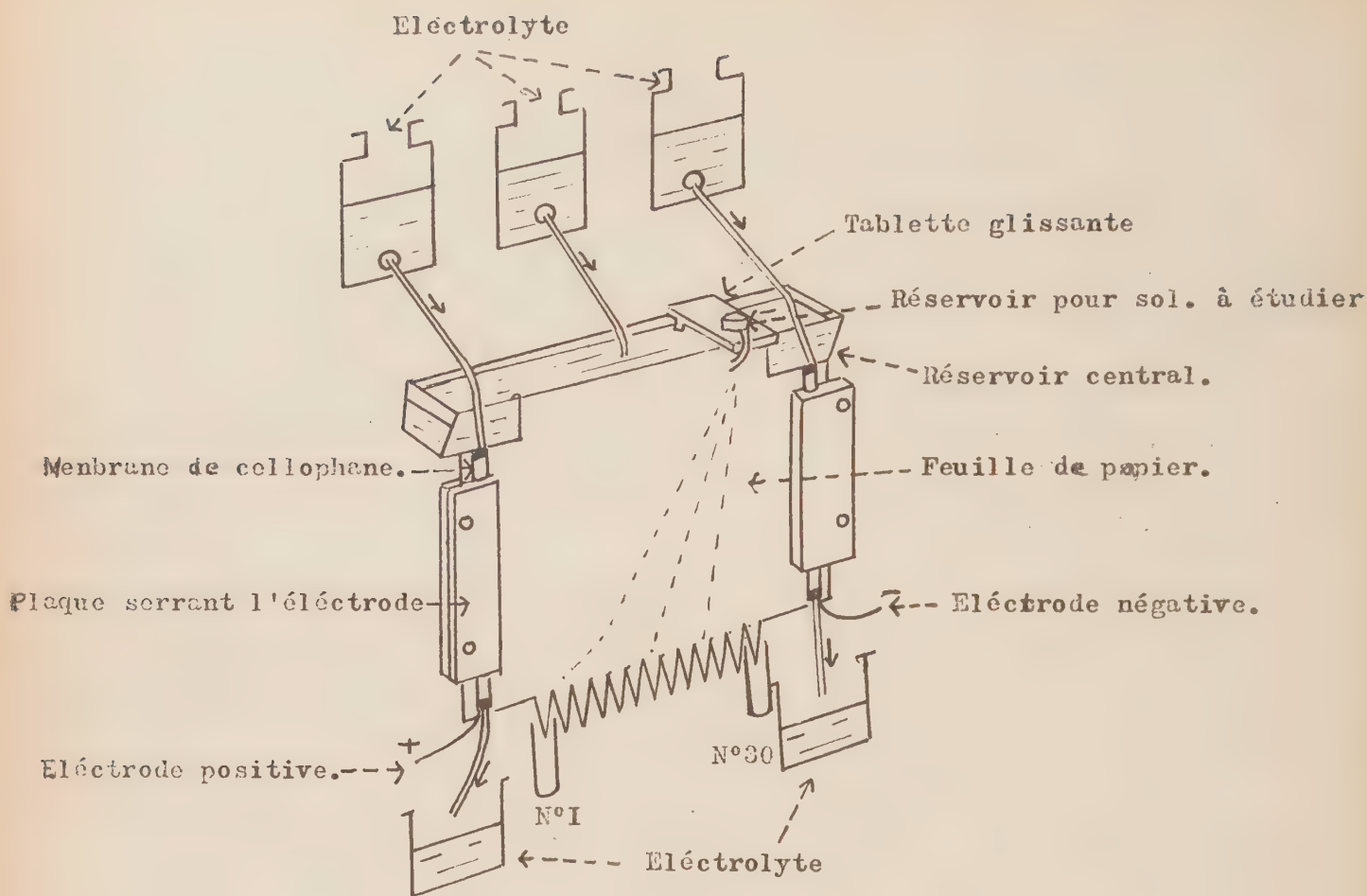
Ce sont des électrodes liquides. Elles sont constituées par des membranes cylindriques en cellophane. Nous avons utilisé les "boyaux" de cellophane employés dans l'appareil à dialyse connu sous le nom de "rein artificiel". A l'intérieur de cette membrane passe le fil de platine conducteur protégé par un petit tube de verre perforé. L'électrolyte est amené à l'aide d'un tube de polytène souple et les produits d'électrolyse sont éliminés de la même façon. Enfin on applique cette membrane contre la feuille de papier qui nous sert de support en la pinçant entre deux plaques de plastique pour que le contact soit le plus étroit possible.

3° Générateur de courant continu.

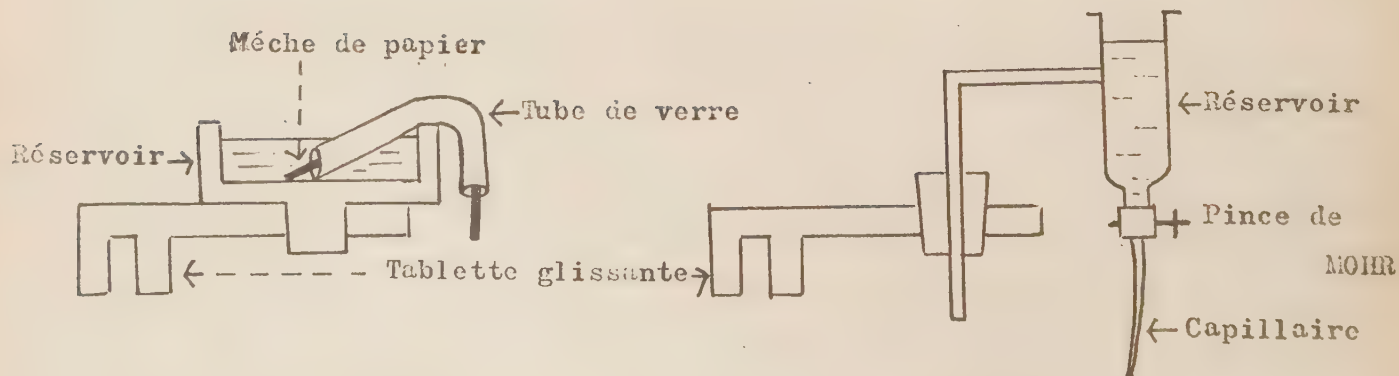
Le bloc utilisé a été spécialement étudié comme source de courant continu pour électrophorèse. Il est utilisable sur un courant alternatif de 110-220 volts qu'il peut redresser et filtrer pour donner un courant continu variable entre 100 et 1 000 volts avec un maximum d'intensité égale à 25 milliampères.

Ce bloc comprend également un régulateur électronique qui rend le débit indépendant des variations des courants de faibles et hauts voltages.

.../...



SCHEMA N° I



SCHEMA N° 2.

SCHEMA N° 3.

B - Mise au point de l'appareil.

Afin d'opérer dans les meilleures conditions nous avons cherché à agir sur les différents facteurs conditionnant l'électrophorèse. Ces facteurs peuvent être de deux ordres : d'ordre général, c'est-à-dire agissant simultanément et dans le même sens sur la vitesse de déplacement des ions ou d'ordre particulier, c'est-à-dire modifiant différentiellement les vitesses ioniques en altérant la nature même de l'ion.

- 1° Facteurs généraux.

Dans ce groupe nous pouvons ranger tous les facteurs capables de modifier le champ électrique, en particulier la tension appliquée aux électrodes et la force ionique de l'électrolyte dans la mesure où elle agit sur la conductivité.

Entrent également dans ce groupe les facteurs qui agissent passivement sur la progression des ions tels que :

- la viscosité de l'électrolyte,
- l'intensité d'évaporation,
- la qualité du papier utilisé.

Nous nous sommes efforcés de maintenir tous ces facteurs aussi constants que possible pendant la durée de nos expériences. De cette façon les résultats obtenus sont comparables entre eux et reproductibles. Pour ceci nous avons été obligés de mettre au point certains dispositifs de l'appareil dont le fonctionnement ne nous donnait pas satisfaction.

a) Alimentation en substance à fractionner.

- un petit récipient en verre muni d'une tubulure est livré avec l'appareil (schéma n° 2). Dans cette tubulure on introduit une languette de papier Watman qui plonge dans le réservoir et vient s'appuyer contre la feuille de papier. Après de nombreux essais nous avons constaté que l'écoulement était insuffisant lorsqu'on utilise cette languette de papier ; ou bien l'écoulement est très ralenti et peut même être nul, ou bien il est beaucoup trop rapide et la substance n'a plus le temps d'être séparée.

Il est possible de faire varier la largeur et l'épaisseur de cette languette ; de toute façon elle ne doit pas dépasser 2 mm de largeur. Nous avons étudié ces variations en utilisant une solution de nitrate de cuivre 0,05 M et une solution d'acide lactique 0,1 M comme solution tampon, la différence de potentiel E étant égale à 900 volts et l'intensité I à 20 mA. Chaque fois nous avons pratiqué des électrophorèses de 5 heures et nous notions le numéro du premier tube où l'on retrouvait l'ion Cuivre séparé. Nous avons également soumis à l'électrophorèse une solution de bleu de méthylène, nous n'avons pu retenir les résultats qu'elle nous donnait, le bleu de méthylène ayant été fortement adsorbé sur la feuille de papier.

- il est possible d'utiliser à la place de la languette de papier une petite mèche de coton hydrophyle ; cependant les meilleurs résultats que nous avons obtenus ont été dûs à l'utilisation d'un petit récipient de verre prolongé par un tube capillaire dont la vitesse d'écoulement est réglée par une pince de Mohr (schéma n° 3). Le capillaire de verre s'appuie très légèrement contre la feuille de papier sans risque de la percer.

b) Alimentation en électrolyte de la feuille de papier à électrophorèse.

L'expérience nous a montré que les feuilles de papier WATMAN n° 4, n° 54 et 3 MM utilisées telles quelles, c'est-à-dire plongeant par leur partie supérieure dans le bac à électrolyte, n'assurent qu'une inhibition insuffisante de la feuille et un écoulement irrégulier.

- l'irrégularité de l'écoulement au voisinage des électrodes est facilement explicable par l'augmentation d'évaporation dans cette zone. C'est un inconvénient car lorsque les fractions séparées arrivent au voisinage de l'électrode elles risquent de ne pas s'écouler et de passer par dialyse dans les membranes de cellophane. Nous avons résolu ce problème en superposant des bandes de papier filtre le long des électrodes, c'est-à-dire en intensifiant l'irrigation par siphonage capillaire.

- l'insuffisance d'écoulement est due au fait que l'appareil que nous utilisons n'est pas muni d'un système réfrigérant, l'évaporation est donc importante. On peut observer alors

- . soit le passage des fractions séparées dans les électrodes,
- . soit une chute d'intensité du champ électrique et par suite une moins bonne séparation des fractions.

Pour remédier à cet inconvénient nous avons étudié plusieurs systèmes. On peut remonter le trop-plein de la cuve d'alimentation en solution tampon, ou introduire une rampe d'arrosage au sommet de la feuille, mais nous n'avons pas retenu ce système car il nous a été impossible d'obtenir un contact étroit et régulier entre la feuille et la partie perforée de la rampe ; enfin il est possible de superposer des bandes de papier filtre sur le rebord de la feuille qui plonge dans le réservoir et qui sert de siphon capillaire. Cependant si l'alimentation est meilleure au centre de la feuille, la phase liquide au niveau des électrodes est encore insuffisante. Pour palier à cette difficulté nous avons modifié la forme de la mèche supplémentaire : plus cette mèche sera incurvée et longue près des électrodes plus l'alimentation sera abondante. Il est ainsi possible de déterminer pour chaque expérience la forme et les dimensions optima pour cette mèche.

Il faut noter qu'une feuille de papier neuve aura un écoulement plus lent qu'une feuille qui aura déjà servi pour plusieurs expériences.

Pour toutes nos expériences nous avons agi dans de telles conditions que la différence de potentiel E , et l'intensité du champ I , étaient maxima ; de cette façon, nous nous sommes malheureusement placés dans les conditions où l'évaporation était maximum.

c) Electrolyte ou solution tampon.

Nous avons vu dans les généralités les éléments qui interviennent sur la vitesse de migration des ions. Cette vitesse est d'autant plus grande que la force du champ électrique est élevée, et que la force ionique et la viscosité de l'électrolyte sont faibles.

La force ionique d'un électrolyte est définie, nous l'avons déjà dit, comme étant égale à la demi-somme étendue à tous les ions de la solution, des produits $C_i Z_i^2$, C_i étant la concentration et Z_i la valence de l'ion d'espèce "i" ; ceci peut s'écrire :

$$\mu = \frac{I}{2} C_i Z_i^2 = \frac{I}{2} (C_{i1} Z_{i1}^2 + C_{i2} Z_{i2}^2 + \dots \text{etc.})$$

Pour toutes nos expériences, afin d'obtenir les résultats les meilleurs, nous nous sommes inspirés de ce principe en employant une différence de potentiel élevée, aux environs de 20 V./cm, et une intensité = 25 mA, maximum permis par l'appareil.

Nous avons été amenés expérimentalement à choisir pour la solution d'électrolyte des résistivités voisines de 1 400 Ohms quand on utilise des feuilles de papier Watman n° 4, n° 54 et 3 MM. Sachant que la résistivité représente l'inverse de la conductivité de la solution tampon, il est facile d'en déduire sa force ionique.

Afin de faciliter l'écoulement de l'électrolyte le long de la feuille nous avons tenté d'accroître sa mouillabilité en ajoutant une substance tensio-active. Si on ajoute 20 mg d'alkylarylsulfonate de sodium SHELL (Dobane) à une solution d'acide formique à 1 g p. 1000, nous n'obtenons aucune augmentation de l'écoulement mais en ajoutant 40 mg p. 1000, il est augmenté de 20 %. Nous avons cependant renoncé à l'utilisation de ce détergent par suite de l'accroissement de force ionique qu'il entraîne.

d) Qualité de la feuille de papier.

Pour toutes nos expériences nous avons utilisé des feuilles de papier Watman n° 1, n° 4 et n° 54 de 18,25 cm de large sur 22,5 cm de long. Le bord inférieur de ces feuilles est découpé en 30 languettes de 1,27 cm de large. Nous avons utilisé ces papiers assez minces pour obtenir une meilleure séparation.

2° Facteurs particuliers.

Nous les avons définis comme étant les facteurs capables de modifier la nature même de l'ion et par là, permettant leur isolement différentiel.

Deux actions sont ainsi possibles; la plus facile à réaliser est l'action directe sur la charge des ions par modification du pH de l'électrolyte, l'autre peut se faire sur la force ionique de l'électrolyte par modification des doubles couches électriques entre les particules en solution et les molécules du solvant.

Si l'influence de la force ionique est faible il n'en est pas de même pour le pH.

Etude de l'influence du pH des électrolytes.(19)

Au cours de ce travail il est apparu que les solutions tampons utilisées devaient répondre à des exigences très strictes pour que les résultats soient reproductibles.

La stabilité de l'électrolyte doit être maintenue pendant toute la durée de l'expérience. Il ne doit pas y avoir formation de corps qui pourraient réagir, soit sur les fractions séparées en les altérant ou en formant un complexe inactif, soit sur le matériel à électrophorèse (l'électrolyse d'une solution tampon au chlorure d'ammonium produit un dégagement de chlore gazeux qui corrode les joints en caoutchouc).

Le pH ne doit pas s'écarter de sa valeur initiale de plus de 0,1 unité. Cette condition n'est pas remplie avec les solutions d'acides minéraux, l'acide chlorhydrique en particulier produit un dégagement de chlore gazeux. Les sels d'acides minéraux en solution non tamponnée entraînent assez rapidement au niveau du papier une variation de pH importante et dissymétrique. Les bases fortes comme le soude donnent des solutions visqueuses et produisent un échauffement considérable.

Au contraire, les solutions d'acides organiques présentent une grande stabilité.

Les solutions salines tamponnées sont stables et ne provoquent pas de variations de pH au niveau du papier. Cependant, nous ne les avons pas utilisées du fait de leur trop forte conductivité.

- Solution de Carbonate d'ammonium à 1,75 g 0/00 pH : 7,9 résistivité : 486 Ohms
 -- " " " " " " + 2 g 0/00 d'ammoniaque pH 9,3
 et résistivité 1414 Ohms.

C'est avec les solutions d'acide formique que nous avons obtenu les meilleurs résultats. L'Acide formique est entièrement et facilement volatil, il sera donc facile de l'éliminer dans les solutions de substances fractionnées. Il est

en outre facile de faire varier le pH de ces solutions en leur ajoutant de l'ammoniaque.

Nous avons ainsi obtenu une gamme étendue de solutions tampons.

<u>Composition de l'Electrolyte</u> (solution dans l'eau distillée)	<u>pH</u>	<u>Résistivité</u>
- Solution d'acide formique à 1,25 g 0/00	2,5	1 244
- Solution d'acide formique à 1 g 0/00	2,8	1 430
- Solution d'acide formique à 2,50 g 0/00		
additionnée d'une solution d'ammoniaque qsp	3,9	
diluée au 1/4	"	1 274
- Solution d'acide formique à 2,50 g 0/00		
additionnée d'une solution d'ammoniaque qsp	5,5	
diluée au 1/2	"	1 306
- Solution d'acide formique à 2,50 g 0/00		
additionnée d'une solution d'ammoniaque qsp	8,6	
diluée à 12 %	"	1 287
- Solution d'acide formique à 2,50 g 0/00		
additionnée d'une solution d'ammoniaque qsp	9,9	
diluée au 1/10	"	1 573

Avec ces différents électrolytes, nous avons étudié comparativement la mobilité électrophorétique des mélanges suivants :

- Salicylate de sodium - quinine.
- Acide benzoïque - caféine.

Ils correspondent à des associations moléculaires en solution, dues surtout à un phénomène d'hydrotropie selon Neuberg.

Ces corps présentent l'avantage d'être fluorescents en lumière ultra-violette. En plaçant une lampe de Wood derrière l'appareil il est très facile de suivre leur migration

o o o

Nous donnerons ici quelques définitions des abréviations que nous allons utiliser tout au long de nos expériences.

- E sera égal à la différence de potentiel appliquée aux bornes de l'appareil, exprimée en Volts.
- I sera égal à l'intensité du champ électrique exprimée en milli-ampères.
- Le bord inférieur de la feuille étant découpé en 30 languettes de 1,27 cm chacune, nous assignons le n° 1 au tube le plus proche de l'anode et le n° 30 au tube le plus proche de la cathode.
- "d" représente la distance parcourue par une substance soit à droite soit à gauche du point d'alimentation pour lequel d = 0. Cette distance est exprimée en cm.
- V sera égal au volume de liquide écoulé dans chaque tube collecteur exprimé en ml.

II - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE DE SELS SIMPLES

Nous étudierons, dans les conditions décrites au chapitre précédent, le comportement électrophorétique de deux sels simples :

- 1 - l'Acétate de Cobalt.
- 2 - le Sulfate de Cuivre.

Ensuite nous procéderons au dosage des ions séparés dans les différents tubes collecteurs situés au bas de la feuille.

o
o o

1 - Electrophorèse d'une solution d'acétate de Cobalt.

Dosage de l'ion Cobalt (10).

Cette méthode de dosage des ions Cobalt utilise la réaction colorée que donne le Cobalt avec l'alpha-nitroso-béta-naphtol. On extrait le composé rouge formé par le chloroforme en milieu tamponné acétique et on procède à la détermination colorimétrique.

Réactifs

- | | | |
|--|-----------------------------------|--------|
| a) Tampon acétique : | Acide Acétique cristallisable | 12 ml |
| | Acétate de sodium cristallisé R.P | 28 g |
| | Eau distillée q s p | 100 ml |
| b) Réactif à l'alpha-nitroso-béta-naphtol. | | |
| | Alpha-nitroso-béta-naphtol | 100 mg |
| | Solution de soude 0,1 N | 20 ml |
| Tiédir et compléter avec de l'eau distillée à 100 ml. Filtrer. | | |

Technique

A 10 ml de solution à doser, neutralisée, on ajoute :

- 5 ml de tampon acétique
- 1 ml de réactif à l'alpha-nitroso-béta-naphtol.

On attend 10 à 15 minutes, on extrait par 5 ml de chloroforme puis on lave la solution chloroformique avec 5 ml d'acide chlorhydrique 0,005 N.

On complète à 25 ml avec du chloroforme et on effectue la lecture colorimétrique au spectrophotomètre de JOBIN et YVON à 480 millimicrons.

Etalonnage

Nous préparons une solution étalon d'acétate de Cobalt à 0,4294 g % dans le tampon à l'acide formique à 1 g p. 1 000. Cette solution contient 1 mg de Cobalt/ml, on la dilue de façon à obtenir une solution à 2 µg de Cobalt/ml.

Expérience n° 1.

Nous préparons une solution d'acétate de Cobalt à 40 µg/ml. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube n° 15.

L'électrolyte est une solution d'acide Formique à 1 g p. 1000 de pH 2,8 et de résistivité 1430 Ohms.

E = 900 V. aux bornes. I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 5 heures.

.../...

Volume de solution écoulé = 1,50 ml ou 60 μg de Cobalt.

Le dosage de l'ion Cobalt a été effectué sur une prise d'essai égale à 3 ml pour tous les tubes de 15 à 30. Dans les tubes n° 1 à n° 15 la recherche du Cobalt est négative.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 480 m μ	μg Cobalt
14	1,27	6	0	0
15	0	6,2	0,030	3,1
16	1,27	6,2	0,077	4,1
17	2,54	6,1	0,066	3,7
18	3,81	6	0,120	5,8
19	5,08	6	0,204	9,2
20	6,35	6,2	0,242	11
21	7,62	5,8	0,080	4
22	8,89	5,8	0,072	3,8
23	10,16	6	0,049	2,9
24	11,43	6	0,019	1,6
25	12,7	6,1	0,015	1,4
26	13,97	6	0	0
27	15,24	6	0	0
Total				53,6 μg

On recueille 89 % des ions Cobalt.

Expérience n° 2.

Nous avons voulu voir l'influence du temps de l'électrophorèse sur la répartition des ions Cobalt, les solutions d'électrolyte et du sel de Cobalt étant les mêmes.

Le dépôt de l'échantillon est aussi fait à la verticale du tube n° 15.

E = 900 V. aux bornes. I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 10 heures.

Volume de solution écoulé = 2,30 ml ou 92 μg de Cobalt.

Le dosage des ions Cobalt est effectué sur une prise d'essai égale à 5 ml pour tous les tubes numérotés de 15 à 30. La recherche du Cobalt est négative dans les tubes n° 1 à n° 15.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 480 m μ	μg Cobalt
15	0	10,1	0	0
16	1,27	11	0	0
17	2,54	11,2	0	0
18	3,81	11	0,250	12
19	5,08	11	0,184	9,2
20	6,35	10,6	0,164	8,8
21	7,62	10,5	0,150	8
22	8,89	10	0,172	9
23	10,16	10	0,130	7,2
24	11,43	10	0,120	6,8
25	12,7	10,3	0,092	4,6
26	13,97	11	0,082	4,4
27	15,24	11,1	0,043	2,6
28	16,51	11,2	0,035	2,4
29	17,78	11,4	0,028	2
30	19,05	11	0	0

On recueille 73 % des ions Cobalt.

Après ces essais il apparaît que les ions Cobalt se trouvent répartis sur un assez grand nombre de tubes cathodiques. Dans la première expérience les maxima de concentration se placent aux tubes n° 18, 19, 20; dans la deuxième expérience le tube n° 18 possède encore la concentration la plus élevée mais on remarque une décroissance plus lente jusqu'au voisinage de la cathode.

Il peut paraître surprenant de voir la faible quantité d'ions Cobalt éliminés au voisinage de la cathode et nous ne saurions minimiser l'entraînement accéléré par le flux de la solution d'électrolyte le long de la feuille de papier.

o

o o

2 - Electrophorèse d'une solution de sulfate de Cuivre.

Nous avons voulu nous rendre compte de l'évolution de l'électrophorèse pour un sel voisin : le Sulfate de Cuivre, en opérant à des concentrations plus élevées et à des pH différents.

Dosage de l'ion Cuivre (9-36).

Nous utiliserons la méthode au diéthylldithiocarbamate de sodium qui donne avec le Cuivre une coloration jaune à brun en milieu peu acide, ou ammoniacal (pH de 5,7 à 9,2). Le composé formé est soluble dans le tétrachlorure de Carbone.

Réactifs.

- Eau distillée dépourvue de Cuivre.
- Solution de diéthylldithiocarbamate de sodium à 0,10 % dans l'eau dépourvue de Cuivre (assez stable à l'abri de la lumière).
- Solution étalon de Cuivre à 0,402 mg/ml de sulfate de Cuivre cristallisé. Cette solution contient 0,102 mg/ml de Cuivre.
- Solution de citrate d'ammonium à 40 % dans l'eau dépourvue de Cu.
- Papier au bleu de thymol à 0,10 % dans l'alcool.

Technique.

A 10 ou 20 ml de solution à doser contenant de 0 à 0,5 mg de Cuivre, on ajoute :

- 5 ml de solution de citrate d'ammonium à 40 %.

On amène à pH 8 (bleu de thymol) avec une solution d'ammoniaque. On ajoute ensuite :

- 5 ml de tétrachlorure de carbone.

On agite pendant deux minutes, on décante et on lave de nouveau avec 5 ml de tétrachlorure. On réunit les liquides d'extraction, on complète à 20 ml et on filtre sur coton.

On effectue la lecture colorimétrique à 436 millimicrons.

o

o o

.../...

Expérience n° 1 -

Nous étudions une solution de sulfate de Cuivre à 0,102 mg/ml Cu^{++} . Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube n° 15.

L'électrolyte est une solution de formiate d'ammonium à pH 4,2 et de résistivité égale à 1470 Ohms.

E = 900 V. aux bornes. I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 5 heures.

Volume de solution écoulé = 3 ml ou 0,306 mg de Cuivre.

Le dosage de l'ion Cuivre est effectué sur une prise d'essai égale à 1 ml pour tous les tubes numérotés de 15 à 30. Les tubes n° 1 à n° 14 ne contiennent pas de Cuivre.

N° tube	d/cm	V/ml	DO 436 mμ	mg Cuivre
15	0	10	0	0
16	1,27	10	0	0
17	2,54	10,2	0,778	0,093
18	3,81	10	0,352	0,030
19	5,08	10	0,880	0,108
20	6,35	10	0,180	0,016
21	7,62	10,1	0	0
22	8,89	10,1	0	0
total =				0,247 mg

On recueille 80,71 % des ions Cuivre.

Expérience n° 2

Nous essayons une solution de sulfate de Cuivre beaucoup plus concentrée, qui contient 6,83 mg/ml de Cuivre, la solution tampon étant la même que dans l'expérience n° 1. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube n° 15.

E = 900 V. aux bornes. I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 8 heures.

Volume de solution écoulé = 1 ml ou 6,83 mg de Cuivre.

Le dosage du Cuivre a été effectué sur une prise d'essai égale à 1 ml pour les tubes numérotés de 18 à 26. La recherche du Cuivre est négative dans les tubes n° 1 à n° 18 et n° 24 à n° 30.

.../...

N° tube	d/cm	V/ml	DO 436 mμ	mg Cuivre
18	3,81	8,2	0	0
19	5,08	8,2	0,381	0,272
20	6,35	8	0,650x2	1,778
21	7,62	8,2	0,725x3	2,040
22	8,89	8	0,700x3	1,960
23	10,16	8	0,260	0,136
24	11,43	8,1	0	0
25	12,7	8,1	0	0
Total =				6,186 mg

On recueille 90,57 % des ions Cuivre.

Il apparaît que dans la première expérience l'écoulement de l'électrolyte est le double de celui de l'expérience à l'acétate de Cobalt. Les ions Cuivre se trouvent très ramassés dans les tubes N° 17, 18, 19, 20, avec un maximum au tube n° 19.

Quant à la deuxième expérience réalisée avec un écoulement plus lent (8 ml en 8 heures) elle montre un étalement à peine supérieur et un peu plus dévié entre les tubes N° 19 et N° 23, le maximum se trouve au tube N° 22 encadré par les tubes 23 et 26 à forte concentration.

Il semble que dans une expérience où la vitesse d'écoulement de la solution de sulfate de Cuivre serait suffisamment faible, il serait possible d'amener les ions Cuivre plus près de la cathode et aussi de les obtenir en solution plus concentrée.

o
o . o

A côté de l'électrophorèse de ces sels métalliques typiques et de dosage facile, nous avons abordé l'étude d'un complexe très particulier d'origine pharmaceutique, le classique "EMETIQUE" ou antimoniotartrate acide de potassium.

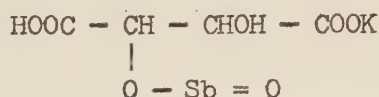
o
o . o

III - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE D'UN MELANGE COMPLEXE :

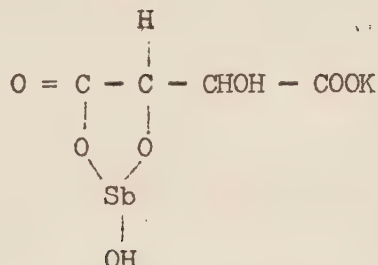
L'ANTIMONIATARTRATE ACIDE DE POTASSIUM ou "EMETIQUE"

L'émétique est un tartrate complexe : c'est l'antimoniotartrate acide de potassium. Sa nature chimique est l'objet de nombreuses controverses ; différentes formules ont été proposées : (41)

- formule de YOUNGFLEISCH en 1882



- formule de BOUGAULT

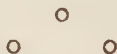


RHEIMLE et HEZEL ainsi que MANN en 1950 ont donné de nouveaux aperçus sur sa constitution.

Nous allons soumettre ce sel à l'électrophorèse : il devrait se décomposer en libérant :

- à l'anode : l'acide tartrique
- à la cathode : l'antimoine et le potassium.

Nous envisagerons donc le dosage de ces différentes fractions.



Dosage de l'Acide Tartrique

Nous avons été amenés à étudier la méthode de MARIER et BOULET (47). Elle met à profit la réaction colorée décrite par FURTH et HERMANN (20) : l'acide citrique en présence de pyridine et d'anhydride acétique donne une coloration jaune. Certaines colorations parasites sont données par d'autres substances :

- l'acide tartrique donne une coloration verte
- l'acide aconitique donne une coloration violette
- l'acide malonique donne une coloration acajou avec fluorescence verte.

Réactifs

- pyridine anhydre RP.
- anhydride acétique RP.
- acide tartrique anhydre RP.

Technique

Dans un tube de verre pyrex à fond rond on introduit :

- 1 ml de solution à doser contenant de 0 à 1 mg/ml d'acide tartrique
- 1,3 ml de pyridine

On agite et on place le tube dans un bain d'eau glacée et on ajoute

- 5,7 ml d'anhydride acétique

On agite et on porte au bain-marie à 37° où la coloration jaune se développe en 30 minutes.

On effectue la lecture colorimétrique au spectrophotomètre de JOBIN et YVON à 460 millimicrons.

On mesure de même la densité optique d'un témoin contenant à la place de la solution à doser 1 ml de solution tampon.

L'étalonnage de l'appareil est fait à l'aide de quantités d'acide tartrique en solution dans le tampon, allant de 0,10 mg/ml à 1 mg/ml.

Il faut noter que cette méthode permet le dosage de l'acide tartrique complexé à l'intérieur de l'émétique.

Acide tartrique mg/ml.	DO 460 mp.
0,10	0,012
0,20	0,029
0,40	0,054
0,60	0,089
0,80	0,131
1	0,170

o
o o

Dosage de l'Antimoine.

Nous avons adopté la méthode de EVAN et CHESNEY (18) utilisée pour le dosage de l'antimoine dans les liquides biologiques, et qui met à profit la réaction colorée que donne les ions Sb^{+++} avec une solution d'iodure de potassium et d'acide ascorbique.

Réactifs

a) réactif à l'iodure de potassium, acide ascorbique :

Iodure de potassium cristallisé RP	112 g
Acide ascorbique cristallisé	20 g

On dissout dans l'eau distillée et on complète à 1 000 ml. Ce réactif se conserve un mois à l'abri de la lumière.

.../...

- b) Solution d'acide sulfurique pur à 16 %.
- c) Solution étalon à 40 µg/ml d'antimoine trivalent.

On dissout 110 mg d'émétique dans 500 ml d'eau distillée, on ajoute 160 ml d'acide sulfurique concentré, on refroidit et on complète à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

Technique

On mesure dans des tubes jaugés à 10 ml, de 0,5 à 2 ml de solution à doser et on complète à 5 ml avec la solution d'acide sulfurique à 16 %. (La concentration optimum en acide sulfurique est de 8 %).

On ajoute : 5 ml de réactif à l'iodure de potassium.

On effectue la lecture colorimétrique 5 minutes après au spectrophotomètre de JOBIN et YVON à 420 millimicrons. Cette coloration est stable 48 heures.

On mesure de même la densité optique d'un témoin composé de :

- 5 ml d'acide sulfurique à 16 %.
- 5 ml de réactif à l'iodure de potassium.

Expérience n° 1.

Nous préparons une solution d'antimoniotartrate acide de potassium gauche à 40 mg/ml. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube n° 15.

L'électrolyte est une solution d'acide formique à 1 g p. 1000 de pH 2,8 et de résistivité = 1430 Ohms.

E = 900 V. aux bornes. I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 12 heures.

Volume de solution écoulé = 2 ml ou 36 mg d'acide tartrique et 29,12 mg d'antimoine trivalent.

A la fin de l'expérience le contenu des tubes collecteurs est évaporé à sec sous une cloche à vide. Le résidu est ensuite repris par 2 ml d'eau distillée :

- 1 ml servira au dosage de l'acide tartrique,
- 1 ml " " " " l'Antimoine.

n° Tube	d/cm	V/ml	DO 420 mμ	mg Antimoine	DO 460 mμ	mg d'ac. tartrique
1	17,78	8,1	0	0	0	0
2	16,51	8,1	0	0	0	0
3	15,24	8	0	0	0,01	0,20
4	13,97	8	0,080	0,096	0,02	0,30
5	12,7	8	0,450	0,548	0,08	1
6	11,43	7,9	0,167	0,208	0,031	0,42
7	10,16	8	0,850	1,032	0,250	1,50
8	8,89	8	0,975	1,184	0,375	2,04
9	7,62	8,1	0,960x2	2,336	0,450	5,44
10	6,35	8,4	0,685x2	1,664	0,276	3,32
11	5,08	8,2	0,715x2	1,744	0,292	3,48
12	3,81	8	0,550x2	1,336	0,149	1,78
13	2,54	7,9	0,510x2	1,240	0,210	2,52
14	1,27	8	0,407x2	0,968	0,162	1,94
15	0	8	0,808x4	3,936	0,143	1,72
16	1,27	8,1	0,860x4	4,160	0,136	1,66
17	2,54	8,4	0,547x4	3,456	0,078	0,96
18	3,81	8,3	0,086x4	0,448	0,005	0,06
19	5,08	8	0,084	0,112	0	0
20	6,35	7,9	0,064	0,088	0	0
21	7,62	8	0,044	0,064	0	0
22	8,89	8,1	0,016	0,024	0	0
23	10,16	8	0	0	0	0
24	11,43	8	0	0	0	0
total =				24,64 mg	total =	28,34 mg

On recueille 84,6 % des ions Antimoine et 78,7 % de l'acide tartrique.

On constate qu'il n'y a pas de séparation nette ni pour l'acide tartrique ni pour l'antimoine. Il y a superposition des deux fractions dans tous les tubes.

Etant donné que les méthodes de dosage que nous utilisons dosent aussi bien l'acide tartrique et l'antimoine libres que l'acide tartrique et l'antimoine complexés dans l'émétique, nous pouvons penser qu'il y a :

- au voisinage de l'anode un mélange d'acide tartrique libre et d'émétique non dissocié ;
- au voisinage de la cathode un mélange d'antimoine libre et d'émétique non dissocié.

Il est possible de déterminer la composition de chaque fraction. Dans l'émétique on a 121,7 g d'antimoine pour 164,15 g d'acide tartrique,

- si on appelle X la teneur en acide tartrique, et p la teneur en Antimoine : on peut écrire :

$$X = \frac{p \times 164,15}{121,7}$$

- si Q représente la teneur en acide tartrique dosé dans les tubes, on aura :

$$Q - X = \text{Teneur en acide tartrique libre dans le tube.}$$

.../...

N° Tube	mg acide tartrique libre	mg "Émétique"	mg antimoine dissocié
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0,20	0	0
4	0,182	0,262	0
5	0,326	1,49	0
6	0,165	0,55	0
7	0,231	2,82	0
8	0,590	3,22	0
9	2,570	6,37	0
10	1,280	4,52	0
11	1,340	4,75	0
12	0,150	3,62	0
13	1	3,36	0
14	0,75	2,64	0
15	0	3,82	2,54
16	0	3,68	2,82
17	0	2,13	2,62
18	0	0,13	0,40
19	0	0	0,168
20	0	0	0,088
21	0	0	0,064
22	0	0	0,024
23	0	0	0

On constate que seulement 45,8 % de l'émétique ont été séparés en ions Antimoine et Acide tartrique.

Après cette électrophorèse de l'"Émétique" gauche à pH 2,8 on constate les phénomènes suivants : d'une part la migration du complexe "Émétique" vers l'anode accompagné d'une proportion importante d'acide tartrique libre, d'autre part la migration vers la cathode d'une faible partie d'émétique dont la progression s'arrête à 4,9 cm du point de départ, alors qu'une proportion beaucoup plus grande de cations antimoniques s'étale sur 8,90 cm, le maximum étant peu éloigné du niveau d'apport de la solution.

Peut-on tirer de cette expérience une conclusion tendant à concevoir l'existence de formules différentes pour ces émétiques dont l'un serait facilement décomposé sous l'influence du champ électrique en acide tartrique et antimoine, tandis que l'autre plus stable et de caractère anionique serait susceptible de migrer lentement vers l'anode. On pourrait aussi envisager une éventuelle décomposition de l'émétique comportant un caractère cathionique un peu plus accusé, ainsi qu'en témoigne la persistance d'émétique dans les tubes n° 15 à n° 18.

o

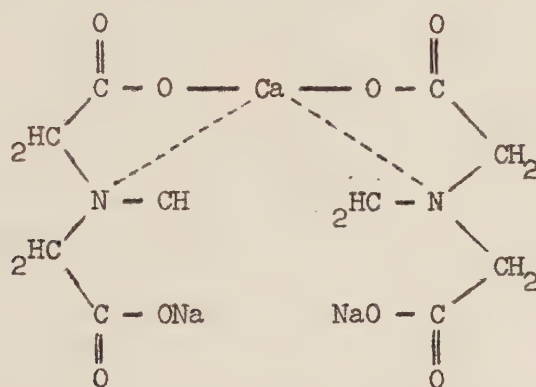
o o

IV - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE DE CHELATES DE L'ACIDE ETHYLENEDIAMINE TETRA-ACETIQUE

Depuis 1940 SCHWARZENBACH et ses collaborateurs ont étudié l'acide éthylènediamine tétra-acétique ou E-D-T-A, ainsi que ses composés voisins.

L'acide est à peu près insoluble dans l'eau, mais il donne des sels dont le plus important est l'éthylène-diamine tétra-acétate de sodium bihydraté, soluble dans l'eau (8).

Ce sel se combine avec les ions métalliques pour donner des cycles complexes qui sont solubles dans l'eau et virtuellement indissociés. Ainsi avec le Calcium on obtient :



Les lignes pleines représentent les valences ordinaires et les lignes pointillées les valences de coordination. Elles indiquent un partage mutuel des forces de valence mais non un passage d'électrons d'un atome à un autre.

Cette union chimique par valence de coordination est responsable de la suppression de l'ionisation.

Le degré de stabilité du calcitétracémate de sodium en solution aqueuse contenant d'autres ions métalliques dépend de la stabilité relative des chélates des métaux présents dans la solution. Ainsi in vitro le Calcium peut être déplacé par le Plomb, le Cobalt, le Nickel, le Chrome et le Fer. In vivo l'E-D-T-A sodique ne peut déplacer ni le Fer de l'hémoglobine, ni le Cobalt de la vitamine B 12 qui sont des complexes forts. (66)

Nous allons soumettre à l'électrophorèse continue deux chélates :

- le chélate de l'E-D-T-A avec le Calcium,
- le chélate de l'E-D-T-A avec le Cuivre.

1 - Electrophorèse du chélate de Calcium et de l'E-D-T-A.

Il nous a fallu envisager le dosage de ces deux ions.

Dosage du Calcium.

Nous avons utilisé la méthode directe au Complexon III ou sel dissodique de l'E-D-T-A (80-58).

.../...

Réactifs

a) Solution dans l'eau bidistillée de Complexon III M/40 à 9,3 mg/ml et M/400 à 0,93 mg/ml.

b) Solution étalon de Calcium à 1 mg/ml.

On dissout 250 mg de Carbonate de Calcium pur pour analyse dans le minimum d'acide chlorhydrique dilué et on complète à 100 ml avec de l'eau bidistillée.

c) Solution alcaline de Cyanure de Sodium.

- Potasse pure en pastilles	450 g
- Cyanure de Sodium pur RP	10 g
- eau bidistillée q s p	1000 ml

d) Indicateur de PATTON et REEDER :

- Acide 2 hydroxy I (2 hydroxy - 4 sulfo - 1 naphtylazo) 3 naphtoïque	ou
réactif de Patton et Reeder	1 g
- Sulfate de Sodium anhydre en poudre très fine	99 g

On triture au mortier de façon à obtenir une poudre homogène.

e) Eau bidistillée.

Technique

- solution à doser	1 ml
- eau bidistillée	10 ml
- solution de cyanure de Sodium	1 ml
- Réactif de Patton et Reeder dilué : une pointe de canif.	

On agite par rotation jusqu'à dissolution du sulfate de Sodium, la coloration est rose.

On titre par le Complexon III en solution jusqu'à coloration bleue.

On titre dans les mêmes conditions 1 ml de solution étalon de Calcium en adoptant le même virage de l'indicateur coloré. Le nombre de ml de solution de Complexon III à 9,3 mg/ml doit être égal à 1.

Calculs

- 1 ml de solution de Complexon III à 0,93 mg/ml	correspond à 0,10 mg de Calcium
- 1 ml " " " " " " " "	à 9,30 " " " " " " " "
	à 1 mg " "

Dosage de l'ion E-D-T-A.

Pour doser l'ion E-D-T-A pouvant apparaître à l'électrophorèse nous avons utilisé la technique précédente mais en sens inverse. On ajoute à la solution à doser un excès de Calcium connu et on titre en retour par addition d'une solution titrée d'E-D-T-A dissodique.

Nous avons vérifié cette méthode en dosant l'ion E-D-T-A dans des solutions de Complexon III de titre connu.

mg E-D-T-A	mg trouvés par le dosage
0,465	0,470
0,930	0,930
1,860	1,865
2,790	2,800

Expérience n° 1.

Nous procédons à l'électrophorèse d'une solution de complexe E-D-T-A, Calcium. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte est une solution de formiate d'Ammonium à pH 3,4 et de résistance égale 1400 Ohms. On utilise de l'eau bidistillée pour faire cette solution.

E = 600 V. aux bornes

I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 14 heures.

Volume de solution écoulé = 2,4 ml ou 2,4 mg d'ion Calcium et 22,32 mg d'E-D-T-A.

Détermination des ions E-D-T-A dans les fractions isolées.

Dans les tubes N° 1 à N° 13 inclus, nous avons ajouté 1 ml d'une solution de Calcium à 1 mg/ml. Pour les tubes centraux N° 14 et N° 15 nous effectuons le dosage sur une prise d'essai égale à deux ml afin de pouvoir doser sur le liquide restant les ions Calcium éventuellement séparés.

On dose ensuite le Calcium en excès par une solution de Complexon III à 9,3 mg/ml.

N° Tube	d/cm	V/ml	ml Complexon à 9,3 mg/ml	mg E-D-T-A séparés
1	17,78	2,4	1	0
2	16,51	4,3	1	0
3	15,24	9,3	0,97	0,28
4	13,97	10,5	0,83	1,59
5	12,7	11,1	0,54	4,20
6	11,43	10,6	0,56	4,11
7	10,16	8,6	0,64	3,36
8	8,89	6,6	0,74	2,43
9	7,62	6,2	0,72	2,61
10	6,35	5,6	0,75	2,33
11	5,08	4	0,95	0,46
12	3,81	5,4	1	0
13	2,54	5,4	1	0
14	1,27	4,8	1	0
15	0	5,5	1	0

total = 21,37 mg

On recueille 95,7 % des ions E-D-T-A.

.../...

Détermination des ions Calcium séparés.

On dose le Calcium à l'aide de la solution de Complexon III à 0,93 mg/ml, sur une prise d'essai = 2 ml pour les tubes N° 14 et N° 15 et sur la totalité du liquide écoulé pour les autres tubes numérotés de 16 à 30.

N° tube	d/cm	V/ml	ml de Complexon à 0,93 mg/ml	mg Calcium séparés
14	1,27	4,8	0	0
15	0	5,5	0	0
16	1,27	4,8	1	0,10
17	2,54	5,1	1,6	0,16
18	3,81	5,5	1,4	0,14
19	5,08	5,5	1,6	0,16
20	6,35	5,7	2	0,20
21	7,62	6,2	2	0,20
22	8,89	6,4	2,3	0,23
23	10,16	7,9	2,3	0,23
24	11,43	8,8	2,8	0,28
25	12,7	8,6	2,5	0,25
26	13,97	8,9	2,3	0,23
27	15,24	4,6	1	0,10
28	16,51	3,7	0	0
29	17,78	2,2	0	0
30	19,05	2,2	0	0
				total = 2,28 mg

On recueille 95 % d'ions Calcium.

Expérience n° 2.

Cette nouvelle expérience sera conduite avec un tampon à pH un peu moins acide, la durée de l'électrophorèse étant à peu près la même mais l'écoulement de l'échantillon étant plus lent.

Nous utilisons la même solution que dans l'expérience précédente, le dépôt étant toujours fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte est une solution de formiate d'Ammonium à pH 4,1 et de résistivité égale 1450 Ohms.

E = 950 V. aux bornes.

I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 4 heures.

Volume de solution écoulé = 1,50 ml ou 1,5 mg de Calcium et 13,95 mg d'E-D-T-A.

Détermination des ions E-D-T-A séparés.

De même que dans l'expérience N° 1 nous ajoutons dans les tubes N° 1 à N° 14 inclus 1 ml de solution de Calcium à 1 mg/ml. Le Calcium en excès est ensuite dosé par une solution de Complexon III à 9,3 mg/ml.

.../...

N° Tube	d/cm	V/ml	ml Complexon à 9,3 mg/ml	mg EDTA séparés
1	17,78	6	1	0
2	16,51	6,2	1	0
3	15,24	6,3	0,96	0,37
4	13,87	6	0,95	0,46
5	12,7	6,4	0,94	0,56
6	11,43	6	0,70	2,60
7	10,16	6,4	0,60	3,72
8	8,89	6,5	0,84	1,49
9	7,62	6,5	0,70	2,60
10	6,35	6,5	0,95	0,46
11	5,08	6,4	0,95	0,46
12	3,81	6,4	0,96	0,37
13	2,54	6,5	1	0
14	1,27	6,5	1	0
				total = 11,09 mg

Séparation des ions Calcium.

On dose le Calcium à l'aide de la solution de Complexon III à 0,93 mg/ml sur une prise d'essai égale à la totalité du liquide écoulé pour les tubes numérotés de 15 à 30.

N° Tube	d/cm	V/ml	ml Complexon à 0,93 mg/ml	mg Calcium séparés
15	0	6,4	0	0
16	1,27	6,3	0	0
17	2,54	6,3	0	0
18	3,81	6,2	0	0
19	5,08	6,4	0	0
20	6,35	6,3	0,5	0,05
21	7,62	6,7	0,5	0,05
22	8,89	6,4	0,6	0,06
23	10,16	6,8	0,8	0,08
24	11,43	6,2	1	0,10
25	12,7	6,4	1,20	0,12
26	13,97	6,8	1,6	0,16
27	15,24	6,8	1,6	0,16
28	16,51	6,4	2,2	0,22
29	17,78	6,0	1,6	0,16
30	19,05	6	0,6	0,06
				total = 1,22 mg

On recueille 79,4 % d'ions EDTA et 81,3 % d'ions Calcium.

Expérience n° 3.

Pour cette 3e expérience le tampon aura un pH = 4,1 comme dans l'expérience n° 2. Par contre la durée de l'électrophorèse sera plus courte et l'écoulement de l'échantillon sera accéléré.

Nous utilisons la même solution de chélate EDTA- Calcium que précédemment. Le dépôt de l'échantillon est encore fait à la verticale du tube N° 15.

E = 400 V. aux bornes.

I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 4 heures.

Volume de solution écoulé = 0,90 ml ou 0,90 mg d'ion Calcium et 8,37 mg d'E-D-T-A.

Détermination des ions E-D-T-A séparés.

Les déterminations sont faites de la même façon que dans les expériences précédentes.

La prise d'essai est égale à la totalité du liquide écoulé pour les tubes de 1 à 14.

N° tube	d/cm	V/ml	ml de Complexon à 9,3 mg/ml	mg EDTA séparés
1	17,78	3	1	0
2	16,51	3	1	0
3	15,24	3,1	1	0
4	13,97	3	1	0
5	12,7	3	1	0
6	11,43	2,8	1	0
7	10,16	3,1	0,98	0,18
8	8,89	3	0,95	0,46
9	7,62	3	0,90	0,96
10	6,35	3	0,70	2,60
11	5,08	3,1	0,70	2,60
12	3,81	3,2	0,94	0,56
13	2,54	3,2	0,95	0,46
14	1,27	3,2	1	0
total =				7,82 mg

Détermination des ions Calcium séparés.

Le dosage des ions Calcium est identique à celui des expériences précédentes.

N° tube	d/cm	V/ml	ml de Complexon à 0,93 mg/ml	mg Calcium séparés
15	0	3,3	0	0
16	1,27	3,3	0	0
17	2,54	3,5	0	0
18	3,81	3	0	0
19	5,08	3	0,50	0,05
20	6,35	3,2	1	0,10
21	7,62	3	2	0,20
22	8,89	3	1,6	0,16
23	10,16	3,1	1,6	0,16
24	11,43	3	1	0,10
25	12,7	2,8	0,60	0,06
26	13,97	2,8	0,40	0,04
27	15,24	2,8	0	0
28	16,51	2,9	0	0
29	17,78	3,1	0	0
30	19,05	3	0	0

On recueille 93,4 % d'ions EDTA et 96,6 % des ions Calcium. total = 0,87 mg

Conclusion

L'étude du chélate que représente l'E-D-T-A calcique montre d'une part qu'à des pH très acides (3,4 et 4,2), l'ion EDTA se déplace vers l'anode sans paraître entraîner le Calcium, et d'autre part que le Calcium est ionisé dans le champ électrique et se déplace vers l'anode sans entraîner l'EDTA.

Malgré la lenteur de l'écoulement dans les deux premiers essais on assiste à une dispersion assez grande des ions séparés, avec des maxima aux tubes N° 6 et 7 pour l'EDTA ; dans la deuxième expérience le maximum pour le Calcium se trouve un peu plus déplacé vers la cathode.

Dans la troisième expérience à pH 4,2, de durée plus courte et d'écoulement plus rapide, on remarque une dispersion moins grande des ions, la progression vers les électrodes est plus limitée.

On serait tenter de voir une mobilité plus grande pour les ions Calcium, ce qui n'exclue pas une certaine nonchalance. La dispersion est-elle en relation avec une hydrophyllie variable des ions Calcium ? Il apparaît après ces expériences que ce chélate laisse totalement ioniser le Calcium complexé, ce qui le différencie nettement de l'Antimoine complexé dans l'Emétique.

2 - Electrophorèse. du chélate de Cuivre avec l'E-D-T-A.

Le Cuivre est capable de donner avec le sel de Sodium de l'E-D-T-A un chélate soluble dans l'eau. Son degré de stabilité est supérieur à celui du chélate E-D-T-A - Calcium.

Nous nous sommes proposés d'étudier le comportement électrophorétique de ce chélate et ainsi de le comparer au Chélate EDTA - Calcium que nous venons de voir.

A l'aide de deux solutions de sel dissodique de l'EDTA et d'acétate de Cuivre, il nous sera facile d'obtenir le chélate EDTA-Cuivre qui a une coloration bleue intense. Pour être, cependant, certains d'avoir complexé tout le Cuivre, nous utiliserons chaque fois une quantité de Cuivre légèrement inférieure à la quantité exactement calculée.

Dosage des ions Cuivre.

Nous adoptons la méthode précédemment utilisée lors de l'électrophorèse du sulfate de Cuivre. Cette méthode met à profit la coloration jaune que donnent les ions Cuivre avec le diéthyl-dithiocarbamate de Sodium en milieu peu acide ou ammoniacal (9 - 36).

Nous avons vérifié que cette méthode permettait le dosage des ions Cuivre à l'intérieur des sels simples, mais aussi à l'intérieur du chélate avec l'E-D-T-A.

Dosage des ions E-D-T-A.

Nous suivons la technique que nous avons adoptée lors de l'électrophorèse du chélate de Calcium. On ajoute dans chaque tube un excès de Calcium que l'on titre par une solution de Complexon III de concentration connue.

.../...

Pour toutes les expériences nous avons utilisé un tampon au formiate d'Ammonium en solution dans de l'eau distillée dépourvue de Cuivre dont le pH est égal à 4,2 et la résistivité à 1470 Ohms. Le dépôt de l'échantillon est fait chaque fois à la verticale du tube N° 15.

Expérience n° 1.

Nous préparons un mélange de deux solutions, l'une contenant 9,30 mg/ml de Complexon III ou sel dissodique de l'EDTA, et l'autre contenant 4,90 mg/ml d'acétate de Cuivre.

E = 900 V. aux bornes. I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 4 heures.

Volume de solution écoulé = 2,5 ml ou 12,285 mg d'EDTA dissodique et 2 mg d'ion Cuivre.

Détermination des ions E-D-T-A séparés.

Dans tous les tubes numérotés de 1 à 14 inclus, nous avons rajouté 1 ml de solution de Calcium à 1 mg/ml. L'excès de Calcium est ensuite dosé par une solution de Complexon III à 9,30 mg/ml.

N° Tube	d/cm	V/ml	ml de Complexon à 9,3 mg/ml	mg EDTA séparés
1	17,78	8,5	1	0
2	16,51	8,5	1	0
3	15,24	8,5	0,95	0,46
4	13,97	8,6	0,92	0,74
5	12,7	8,6	0,90	0,92
6	11,43	8,8	0,90	0,92
7	10,16	8,8	0,80	1,84
8	8,89	8,8	0,75	2,60
9	7,62	9	0,86	1,31
10	6,35	9,2	0,86	1,31
11	5,08	10	0,90	0,92
12	3,81	10	0,95	0,46
13	2,54	10	1	0
14	1,27	10	1	0
				total = 11,48 mg

Détermination des ions Cuivre séparés.

N° Tube	d/cm	V/ml	Prise d'essai	DO 436 mμ	mg Cuivre séparés
14	1,27	10	2 ml	0	0
15	0	10	"	0,427	0,210
16	1,27	10	1 ml	0,450	0,450
17	2,54	10	0,5 ml	0,530	1,020
18	3,81	10	5 ml	0,375	0,068
19	5,08	10	5 ml	0	0
20	6,35	10	5 ml	0	0
					total = 1,754 mg

On recueille 93,4 % des ions EDTA et 87,9 % des ions Cuivre.

Expérience n° 2.

Nous utilisons le même mélange que dans l'expérience précédente.

E = 800 V. aux bornes. I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 8 heures.

Volume de solution écoulé = 2,3 ml ou 6,870 mg d'ion EDTA et 1,050 mg d'ion Cuivre.

Détermination des ions E-D-T-A séparés.

Le dosage est effectué sur une prise d'essai égale à la totalité du liquide écoulé auquel on rajoute 1 ml de solution de Calcium à 1 mg/ml pour les tubes numérotés de 1 à 12.

N° Tube	d/cm	V/ml	ml de Complexon à 9,3 mg/ml	mg EDTA séparés.
1	17,78	8,5	1	0
2	16,51	8,5	1	0
3	15,24	9	1	0
4	13,97	9	0,96	0,37
5	12,7	9	0,94	0,56
6	11,43	9	0,90	0,92
7	10,16	9,5	0,86	1,31
8	8,89	9,5	0,80	1,87
9	7,62	9,5	0,90	0,92
10	6,35	9,5	0,90	0,92
11	5,08	10	0,95	0,46
12	3,81	10	1	0
				total = 5,33 mg

Détermination des ions Cuivre séparés.

Le dosage est effectué sur une prise d'essai égale à la totalité du liquide écoulé pour les tubes N° 16 à 29. La recherche des ions Cuivre dans les autres tubes est négative.

.../...

N° tube	d/cm	V/ml	DO 436 mμ	mg Cuivre dans le tube
16	1,27	10	0	0
17	2,54	10	0	0
18	3,81	10	0,880	0,106
19	5,08	9,5	0,525x2	0,115
20	6,35	9,6	0,810x2	0,194
21	7,62	9,5	0,420x2	0,240
22	8,89	9,5	0,510x2	0,106
23	10,16	9,2	0,430x2	0,082
24	11,43	9,1	0,700	0,080
25	12,7	9,1	0,400	0,037
26	13,97	9	0,250	0,015
27	15,24	9	0,109	0
28	16,51	8,5	0	0
29	17,78	8,5	0	0

total = 0,977 mg

On recueille 77,6 % des ions EDTA et 93 % des ions Cuivre.

Expérience n° 3.

Pour cette nouvelle électrophorèse nous utilisons une solution 10 fois plus concentrée que pour les expériences précédentes. Elle est constituée par le mélange d'une solution de Complexon III à 62,5 mg d'EDTA/ml et d'une solution d'Acétate de Cuivre à 10 mg de Cu^{++} /ml.

E = 800 V. aux bornes.

I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 14 heures.

Volume de solution écoulé = 2 ml ou 62,5 mg d'EDTA et 10 mg d'ion Cuivre.

Détermination des ions E-D-T-A séparés.

A la prise d'essai choisie on ajoute 1 ml de solution de Calcium à 1 mg/ml.

N° Tube	d/cm	V/ml	Prise d'essai	ml CompL à 9,3 mg/ml	mg EDTA
1	17,78	5,8	5,8 ml	1	0
2	16,51	5,8	5,8 ml	0,98	0,18
3	15,24	5,8	1 ml	0,98	1,04
4	13,97	5,9	1 ml	0,95	2,66
5	12,7	6	1 ml	0,93	3,89
6	11,43	6	1 ml	0,83	6,36
7	10,16	6	1 ml	0,70	16,98
8	8,89	6,1	1 ml	0,74	14,54
9	7,62	6	1 ml	0,83	6,36
10	6,35	6	1 ml	0,96	2,16
11	5,08	6	3 ml	0,98	0,36
12	3,81	6,1	6,1 ml	1	0

total = 54,53 mg

.../...

Détermination des ions Cuivre séparés.

N° Tube	d/cm	V/ml	Prise d'essai	DO 436 mμ	mg Cuivre
25	12,7	6,3	6,3 ml	0	0
26	13,97	6,4	6,4 ml	0	0
27	15,24	6,5	1 ml	0,780	0,600
28	16,51	6,5	1 ml	0,340x5	0,910
29	17,78	7	1 ml	0,490x10	3,470
30	19,05	7	1 ml	0,590x10	4,600
					total = 9,580 mg

La recherche des ions Cuivre est négative dans les autres tubes.

On recueille 87,2 % des ions EDTA et 95,8 % des ions Cuivre.

Conclusions

Ces expériences à pH 4,2 se différencient essentiellement par leur durée et par leur vitesse d'écoulement décroissante.

On assiste à une dispersion de l'ion E-D-T-A à peu près comparable aux expériences sur le chélate de Calcium ; on a toujours des maxima au niveau des tubes N° 7 et N° 8.

Pour l'ion Cuivre, quand la vitesse d'écoulement est rapide (exp n° 1) il est peu dispersé (tubes N° 15 à N° 18) le maximum étant au tube N° 17. Lorsque la vitesse est réduite de moitié (exp n° 2) la dispersion est beaucoup plus grande, le Cuivre est plus décalé vers la cathode (tubes N° 18 à N° 26) avec un maximum au tube N° 20 et surtout N° 21. Enfin à vitesse encore plus faible (exp n° 3) l'affinité cathodique du Cuivre est accentuée (tubes N° 27 à N° 30) les tubes N° 29 et N° 30 atteignant de hautes concentrations.

La notion de mobilité de l'ion Cuivre par rapport aux ions E-D-T-A est très évidente. Il apparaît d'une part que le Cuivre s'ionise nettement dans le champ électrique en abandonnant l'ion chélateur, et d'autre part qu'il est possible de concentrer les ions ainsi mobilisés dans un petit nombre de tubes cathodiques si l'opération est conduite assez lentement. Nous avons déjà fait les mêmes constatations lors de l'électrophorèse du sulfate de Cuivre.

o
o o

.../...

V - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE DES COMPLEXES COBALTIQUES :

CYANOCOBALAMINE ET HYDROXOCOBALAMINE.

Les précédentes études d'électrophorèse continue sur les chélates et les complexes du type "Emétique" nous ont montré la différence de stabilité très marquée du métal dans ces divers composés. Il nous a paru intéressant d'étudier le comportement de ces complexes si importants au point de vue biologique que sont les vitamines B₁₂ dans lesquelles la liaison d'un atome de Cobalt à la molécule rappelle celle du Fer dans l'hémoglobine.

1 - La CYANOCOBALAMINE.

En 1948 la vitamine B₁₂ a été isolée des extraits de foie simultanément par SMITH et PARKER en Angleterre, et par RICKES, BRINK, KOMINSKI, WOOD et FOLKERS aux Etats-Unis.

La formule complète a été établie en 1955 par TOOD et ses collaborateurs (5).

Dans cette formule on remarque la position de l'atome de Cobalt au centre d'un noyau tétrapyrrolique multisubstitué. Si la liaison du Cobalt ressemble à celle du Fer dans l'hémoglobine et à celle du Magnésium dans la chlorophylle, il faut noter qu'il est encore uni d'une part au radical CN⁻, et d'autre part à un groupement analogue à celui des nucléotides qui comprend un sucre : le D. Ribofuranose, deux bases : le Diméthylbenzimidazol et l'Aminopropanol et enfin l'acide phosphorique. C'est un complexe cobaltique hexacoordiné, c'est une cyanopentammine avec une liaison ionique entre le groupement phosphoryl et le complexe central monovalent.

L'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline (1 - 3 - 6) ont conduit à l'isolement du 5.6 diméthylbenzimidazol nucléotide. Les pigments contenant du Cobalt obtenus par hydrolyse ont été soumis à l'électrophorèse sur papier : l'ion Cobalt n'a pas été libéré et la coloration rose des pigments a toujours persisté.

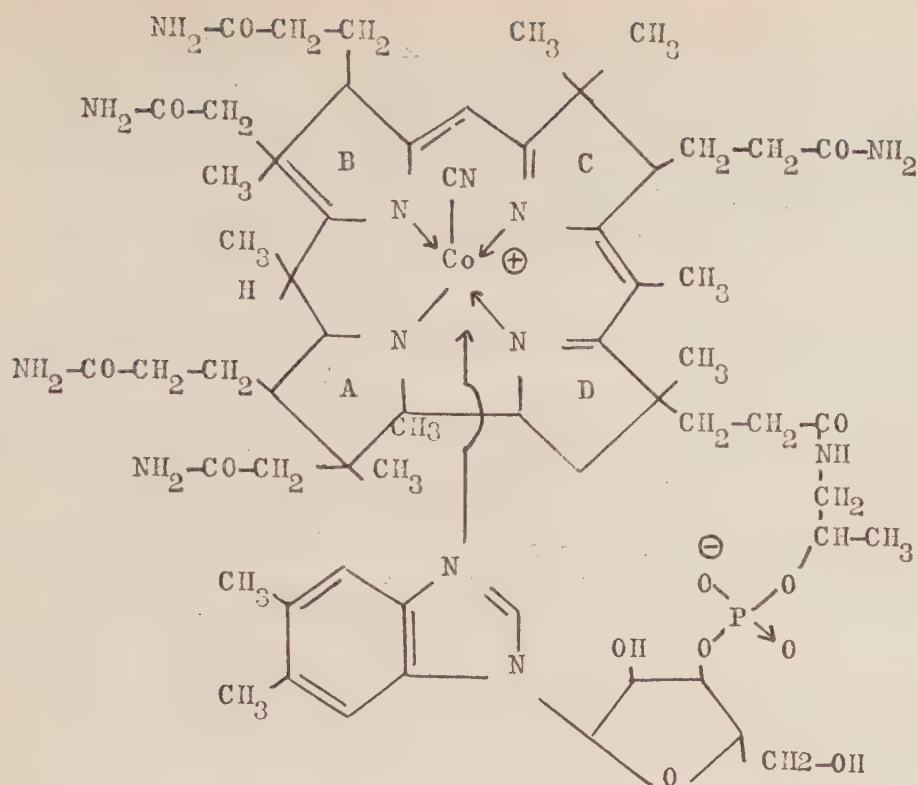
2 - L'HYDROXOCOBALAMINE.

Une autre forme de vitamine B₁₂ a été plus récemment étudiée : c'est la vitamine B_{12a} ou hydroxocobalamine. Connue depuis 1949, ses propriétés furent longtemps méconnues. Elle correspond à la cyanocobalamine dans laquelle le groupement CN⁻ a été remplacé par l'hydroxyl OH⁻.

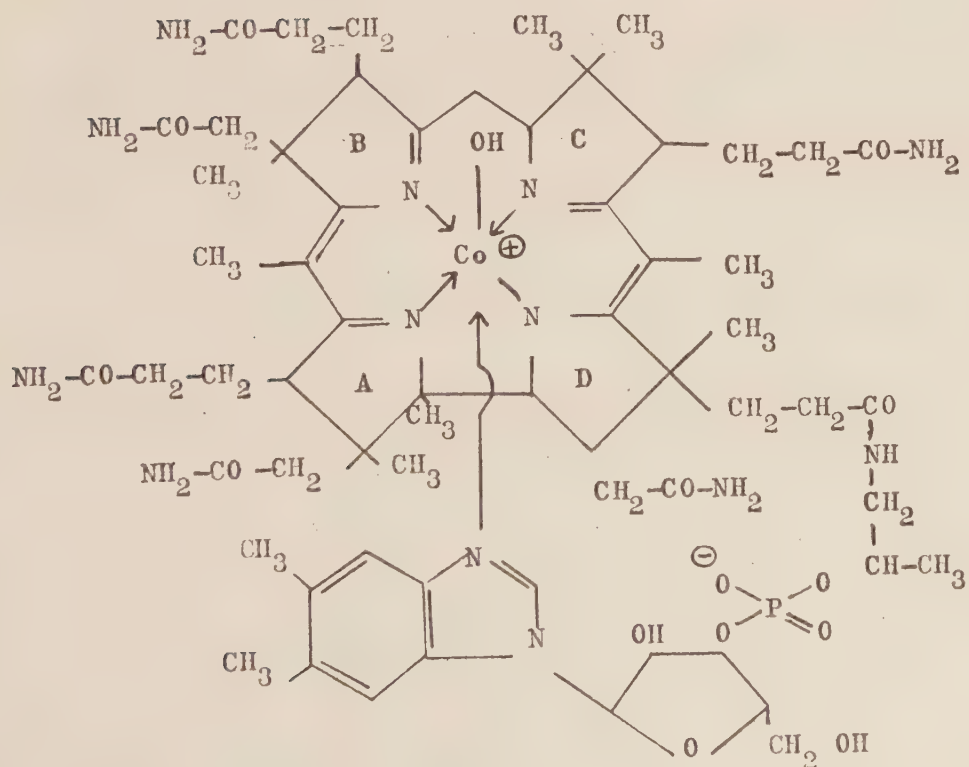
VEER, LENS et WIGMENGA ont étudié la réaction de décomposition de la cyanocobalamine sous l'influence de la lumière en solution aqueuse à pH 5,5 : elle se décompose en donnant l'hydroxocobalamine et l'acide cyanhydrique. Cette réaction est réversible.

En fait la cyanocobalamine représente semble-t-il un artéfact dû à l'adjonction de cyanure dans les procédés habituels d'extraction. Pour agir dans l'organisme elle doit être enzymatiquement transformée en hydroxocobalamine (65).

L'hydroxocobalamine se comporte comme une base faible ainsi que le laisse prévoir la formule développée.



CYANOCOBALAMIN.



HYDROXOCOBALAMINE

.../...

A l'électrophorèse en milieu acétique elle migre plus rapidement vers la cathode que la cyanocobalamine qui demeure sensiblement au point de dépôt (12).

Cyanocobalamine et Hydroxocobalamine sont largement répandues en thérapeutique et spécialisées. Pour nos recherches nous avons utilisé pour la Cyanocobalamine : la spécialité "DOCEMINE 1000 et 5000 µg" et pour l'Hydroxocobalamine : la spécialité "DOCELAN 1000 µg". Toutes deux sont fabriquées par les laboratoires ROUSSEL.

Pour les expériences nous avons adopté le protocole suivant :

- 1° Electrophorèse d'une solution de cyanocobalamine "DOCEMINE".
- 2° Electrophorèse d'une solution de cyanocobalamine "DOCEMINE", additionnée d'acétate de Cobalt.
- 3° Electrophorèse d'une solution d'hydroxocobalamine "DOCELAN".
- 4° Electrophorèse d'une solution d'hydroxocobalamine "DOCELAN" additionnée d'acétate de Cobalt.
- 5° Electrophorèse d'un mélange à parties égales de cyanocobalamine et d'hydroxocobalamine.
- 6° Electrophorèse d'un mélange à parties égales de cyanocobalamine, d'hydroxocobalamine et d'acétate de Cobalt.

o
o o

Nous envisagerons d'abord le dosage des substances que nous allons étudier.

Dosage de la Cyanocobalamine et de l'Hydroxocobalamine.

Nous utiliserons la méthode spectrophotométrique qui consiste à mesurer l'extinction au maximum d'absorption en lumière ultra-violette pour ces corps.

En solution dans le tampon à l'acide formique à 1 gr p. 1000 et pH 2,8, nous avons obtenu des maxima :

- pour la cyanocobalamine à 279 et 362 millimicrons.
- pour l'hydroxocobalamine à 274 et 351 millimicrons.

Il est ensuite possible d'établir des courbes d'étalonnage avec des solutions de cyanocobalamine et d'hydroxocobalamine dans le tampon à pH 2,8 de titre connu, dont on mesure les densités optiques (D₀)

Cyanocobalamine µg/ml	3,5	5	10	15	20
D ₀ 279 millimicrons	0,040	0,068	0,116	0,182	0,234
D ₀ 362 millimicrons	0,054	0,101	0,193	0,285	0,380
Hydroxocobalamine µg/ml	2,5	5	10	15	20
D ₀ 351 millimicrons	0,020	0,080	0,198	0,290	0,430

Nous avons vérifié que l'addition d'ions Cobalt aux solutions ne faisait pas varier la densité optique.

.../...

Dosage de l'ion Cobalt.

Nous utiliserons la méthode précédemment décrite lors de l'électrophorèse de l'acétate de Cobalt (10).

Nous avons vérifié que cette méthode ne dosait pas l'ion Cobalt complexé à l'intérieur des vitamines B₁₂.

o
o o

Pour toutes nos électrophorèses de Vitamines B₁₂ nous utiliserons le tampon à l'acide formique à 1 g p. 1000 pH 2,8 et résistivité 1430 Ohms.

o
o o

1 - Cyanocobalamine.

Expérience n° 1.

Nous préparons une solution de cyanocobalamine "DOCEMINE" à 1000 µg/ml le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 600 V. aux bornes I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 8 heures.

Volume de cyanocobalamine écoulé = 0,6 ml ou 600 µg.

La recherche de l'ion Cobalt dans les différents tubes de 1 à 30 a été négative.

N° tube	Coloration	d/cm	V/ml	DO 279 mµ	µg cyanocobalamine
13	incoloré	2,54	5,6	0	0
14	"	1,27	5,7	0	0
15	"	0	5,8	0	0
16	"	1,27	5,7	0,005	0
17	rose pâle	2,54	5,6	0,130	58,24
18	rose foncé	3,81	6	0,390	211,20
19	rose	5,08	6	0,270	93,60
20	rose pâle	7,62	5,5	0,157	46,75
21	rose très pâle	8,89	5,6	0,084	25,20
22	incoloré	10,16	5,6	0,050	15,12
23	"	11,43	5,7	0,010	3,42
24	"	12,70	5,7	0	0
25	"	13,97	5,6	0	0
					total = 463,53 µg

On recueille 77,25 % de cyanocobalamine.

.../...

Cet essai traduit une migration lente dans le champ électrique de la molécule entière de cyanocobalamine. Le volume de solution tampon écoulé étant faible, il conditionne peut-être l'absence d'entraînement dans les tubes centraux N° 1 à 17, le maximum se trouvant au tube N° 18.

Expérience n° 2.

Nous préparons une solution de cyanocobalamine "DOCEMINE" à 5000 µg/ml, à laquelle on ajoute 0,10 ml d'une solution d'acétate de Cobalt à 400 µg/ml. Le dépôt d'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 900 V. aux bornes. I = 24 mA

Durée de l'électrophorèse = 4 heures.

Volume de mélange écoulé = 0,8 ml ou 3,500 µg de cyanocobalamine et 40 µg de Cobalt.

La recherche de l'ion Cobalt a été négative dans les tubes numérotés de 1 à 15.

Le dosage du Cobalt a été effectué sur une prise d'essai égale à la totalité de l'écoulement.

N° tube : Coloration : d/cm : V/ml : DO 279mp:µg cyanocobalamine:DO480mp:µg Cobalt

14	incolore	1,27	5	0	0	0	0
15	"	0	5	0,010	3,2	0,044	1,3
16	rose	1,27	7,5	0,135	82,5	0,048	1,4
17	rose	2,54	10	0,737	635	0,192	4,8
18	rose foncé	3,81	10	0,985	845	0,250	6
19	" "	5,08	10,5	0,321	287,7	0,184	4,6
20	" pâle	6,35	2,5	0,258	55	0,082	2,2
21	" "	7,62	2,6	0,143	30,16	0,063	1,8
22	" "	8,89	2,6	0,148	32,24	0,075	2
23	" "	10,16	2,5	0,155	31,75	0,028	1
24	" "	11,43	3,3	0,122	32,34	0,035	1,2
25	" "	12,7	2,5	0,162	33	0,043	1,3
26	" "	13,97	2,4	0,175	36,25	0,039	1,25
27	" "	15,24	3,1	0,090	21,70	0,044	1,3
28	" "	16,51	2,4	0,101	19,2	0,086	2,25
29	incolore	17,78	3,3	0,048	10,56	0,060	1,7
30	"	19,05	2,3	0,028	3,22	0,065	1,8
				total = 2 158,74 µg		total = 35,10µg	

On recueille 61,6 % de cyanocobalamine et 87,7 % des ions Cobalt.

Cette deuxième expérience effectuée en un temps plus court (4 H. au lieu de 8 H) mais avec une quantité 6 fois plus forte en cyanocobalamine montre un étalement beaucoup plus large de la migration de la vitamine tandis qu'un bloc dense se trouve encore au niveau des tubes 17-18-19.

Le Cobalt migre sur toute la largeur de la feuille avec un léger maximum précathodique au tube N° 28, tandis qu'un bloc de 3 maxima beaucoup plus important se trouve aux tubes 17-18-19 là où également l'élimination de la cyanocobalamine est de beaucoup la plus forte. Il semble que ces derniers maxima soient dûs à l'entraînement d'électrolyte très important dans ces tubes.

o
o o

2 - Hydroxocobalamine.

Expérience n° 3.

Nous préparons une solution d'hydroxocobalamine ("DOCELAN" à 1000 µg/ml) le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 900 V. aux bornes.

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 5 heures.

Volume d'hydroxocobalamine écoulé = 0,5 ml ou 500 µg.

La recherche de l'ion Cobalt est négative dans les différents tubes de 1 à 30.

Il faut noter qu'à partir du point d'alimentation on distingue nettement deux traînées : l'une rose pâle, l'autre jaune orangé la plus près de la cathode, ces deux traînées s'estompent rapidement.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 351 µg	µg Hydroxocobalamine
14	1,27	4,3	0	0
15	0	4,4	0	0
16	1,27	4,4	0,036	13,2
17	2,54	4,4	0,066	19,36
18	3,81	4,6	0,075	22,08
19	5,08	4	0,098	22,4
20	6,35	4,4	0,121	29,48
21	7,62	5,3	0,149	42,4
22	8,89	5,3	0,183	49,82
23	10,16	5,7	0,165	49,02
24	11,43	5,3	0,084	27,56
25	12,7	4,5	0,061	18,45
26	13,97	3,8	0,030	10,64
27	15,24	3	0,017	6,6
28	16,51	3,8	0,010	7,6
29	17,78	3,7	0	0
30	19,05	3,5	0	0
				total : 318,61 µg

On recueille 63,72 % d'hydroxocobalamine.

.../...

Cette expérience montre un étalement très accusé de la migration de l'hydroxocobalamine qui paraît traduire une mobilité plus grande que celle de la cyanocobalamine. Les maxima de concentration se trouvent au niveau des tubes 21-22-23. Ils sont les témoins d'un écoulement en électrolyte plus intense, sans que l'on puisse rendre ce dernier totalement responsable de l'élimination de l'hydroxocobalamine.

Expérience n° 4.

Nous préparons une solution d'hydroxocobalamine "DOCELAN" à 1000 µg/ml à laquelle on ajoute 0,15 ml d'une solution d'acétate de Cobalt à 400 µg/ml, le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 900 V. aux bornes

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 10 heures.

Volume de mélange écoulé = 0,75 ml ou 1 000 µg d'hydroxocobalamine et 60 µg de Cobalt.

La recherche de l'ion Cobalt est négative dans les tubes numérotés de 1 à 14.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 351 mµ	µg hydroxocobalamine	DO 480 mµ	µg Cobalt
14	1,27	5,7	0	0	0	0
15	0	5,7	0	0	0,050	1,5
16	1,27	5,8	0,015	14,5	0,102	2,6
17	2,54	4	0,030	12	0,110	2,7
18	3,81	3,8	0,086	20,9	0,116	2,8
19	5,08	7	0,054	22,4	0,202	4,6
20	6,35	6,5	0,107	41,6	0,260	5,8
21	7,62	8,5	0,182	81,6	0,173	4
22	8,89	10,7	0,171	98,44	0,242	5,4
23	10,16	13,4	0,156	113,9	0,097	1,4
24	11,43	14,4	0,015	36	0,110	2,7
25	12,7	15,9	0,006	11,76	0,086	2,2
26	13,97	14,7	0,006	11,76	0,075	2
27	15,24	15	0	0	0,060	1,7
28	16,51	15,2	0	0	0,030	1
29	17,78	15,3	0	0	0	0
30	19,05	15,5	0	0	0	0
				total = 461,81 µg		total = 40,4 µg

On recueille 76,98 % d'hydroxocobalamine et 67,30 % des ions Cobalt.

Cette expérience montre la difficulté présentée par l'appareil pour obtenir un écoulement d'électrolyte régulier. A partir du tube N° 19 il est beaucoup accru et ainsi une partie importante d'hydroxocobalamine à migration lente est entraînée. Le même phénomène s'observe pour le sel de Cobalt surajouté.

En première approximation il ne semble pas que l'on puisse établir des interrelations entre la migration de l'ion Cobalt et celle de l'hydroxocobalamine.

.../...

Expérience n° 5.

Nous préparons une solution d'hydroxocobalamine "DOCELAN" à 1000 µg/ml à laquelle on ajoute 0,10 ml d'une solution d'acétate de Cobalt à 400 µg/ml, le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 900 V. aux bornes.

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 5 heures.

Volume de mélange écoulé = 0,70 ml ou 700 µg d'hydroxocobalamine et 40 µg de Cobalt.

Le dosage de l'ion Cobalt sera effectué sur une prise d'essai égale à la totalité de l'écoulement pour les tubes de 14 à 26. Dans les tubes N° 1 à N° 14 la recherche de l'ion Cobalt est négative.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 351 mµ	µg hydroxocobalamine	DO 480 mµ	µg Cobalt
14	1,27	4,6	0	0	0	0
15	0	4,5	0,045	15,75	0,030	1
16	1,27	4,5	0,076	21,60	0,077	2
17	2,54	4,7	0,113	31,96	0,066	1,8
18	3,81	6	0,240	70,80	0,120	2,9
19	5,08	6,5	0,285	89,70	0,204	4,6
20	6,35	8,5	0,238	100,30	0,242	5,4
21	7,62	8	0,194	91,20	0,080	2,1
22	8,89	9,3	0,024	37	0,072	1,9
23	10,16	9,3	0	0	0,049	1,45
24	11,43	9,2	0	0	0,019	0,80
25	12,70	9	0	0	0,015	0,70
26	13,97	9	0	0	0	0
				Total : 458,31 µg	Total : 24,65 µg	

On recueille 65,47 % d'hydroxocobalamine et 61,10 % des ions Cobalt.

Cette expérience dans laquelle se manifeste encore un accroissement de l'écoulement de l'électrolyte à partir du tube N° 18 est un peu superposable à l'expérience précédente dans la mesure où la migration de l'hydroxocobalamine est interrompue à partir du tube N° 22, tandis que se poursuit celle du sel de Cobalt.

Il paraît dès lors difficile de comparer cette expérience tronquée ainsi que la précédente, à celle qui concerne la cyanocobalamine. Néanmoins il faut noter que la mobilité de ces grosses molécules est nettement inférieure à celle de l'ion Cobalt.

o

o o

3 - Electrophorèses de mélanges de Cyanocobalamine et d'Hydroxocobalamine.

Il semblait que le dosage de ces deux vitamines si voisines pouvait être fait selon les méthodes spectrophotométriques en établissant des équations d'après des densités optiques spécialement sélectionnées. L'expérience nous a cependant montré que nous ne pouvions pas trouver de points caractéristiques des spectres des vitamines présentant des différences de densités optiques suffisantes.

On pouvait penser que des interférences interdisaient des calculs valables. Dès lors considérant les colorations croissantes et décroissantes des tubes qui recueillent les fractions, nous avons pu noter des discontinuités assez caractéristiques et nous avons été amenés, en fonction des déterminations précédentes sur les solutions de cyanocobalamine et d'hydroxocobalamine isolées seules, à considérer que dans les électrophorèses de solutions mélangées la fraction la plus centrale, nettement séparée de l'autre correspondait à la cyanocobalamine, tandis que la fraction la plus cathodique correspondait à l'hydroxocobalamine.

Pour chacune des fractions nos dosages ont été effectués respectivement aux densités optiques égales à 362 et 351 millimicrons.

Expérience n° 6.

Nous préparons un mélange composé de 0,30 ml d'une solution de cyanocobalamine à 1000 $\mu\text{g/ml}$ et de 0,30 ml d'une solution d'hydroxocobalamine à 1000 $\mu\text{g/ml}$, le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 15.

E = 900 V. aux bornes.

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 8 heures.

Volume de mélange écoulé = 0,60 ml ou 300 μg de cyanocobalamine et 300 μg d'hydroxocobalamine.

On note une séparation immédiate au point d'alimentation en trois traînées : une traînée rose sombre, une traînée rose plus pâle et une traînée jaune.

La recherche de l'ion Cobalt a été négative dans les différents tubes de I à 30.

Séparation de la cyanocobalamine.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 362 m μ	μg Cyanocobalamine
13	2,54	2,8	0	0
14	1,27	2,8	0,003	0
15	0	3	0,005	0
16	1,27	3,2	0,347	58,90
17	2,54	2,8	0,840	125,44
18	3,81	3,1	0,065	9,30
19	5,08	3,3	0,010	1
220	6,35	3,2	0	0
				total : 194,64 μg

.../...

Séparation de l'hydroxocobalamine.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 351 mμ	μg hydroxocobalamine
20	6,35	3,2	0	0
21	7,02	2,6	0,010	5,20
22	8,89	2,4	0,014	5
23	10,16	2,5	0,018	5,5
24	11,43	3,2	0,040	10,56
25	12,7	2,9	0,096	16,24
26	13,97	3,4	0,146	26,86
27	15,24	3,5	0,181	32,90
28	16,51	2,8	0,230	32,20
29	17,78	2,8	0,220	30,80
30	19,05	3,8	0,068	20,52
				total = 185,78 μg

On recueille 64,88 % de cyanocobalamine et 61,92 % d'hydroxocobalamine.

Cette expérience est correcte quant à l'écoulement de l'électrolyte. On note des volumes à peu près comparables dans tous les tubes.

Pour la cyanocobalamine nous retrouvons comme dans l'expérience n° 1 une faible migration traduite par une élimination massive au niveau des tubes N° 15, 16, 17 ; par contre l'hydroxocobalamine, comme dans l'expérience n° 3, poursuit sa migration assez accusée et régulière vers la cathode du tube N° 24 au tube N° 30 avec de légers maxima aux tubes N° 27, 28, 29 ; on peut même penser qu'une partie a pu migrer dans la cathode elle-même.

Cette expérience paraît accuser la différence de conductivité de ces deux complexes, l'hydroxocobalamine ayant une mobilité supérieure à celle de la cyanocobalamine.

Expérience n° 7.

Nous préparons un mélange composé de 0,45 ml de solution de cyanocobalamine à 1000 μg/ml et de 0,45 ml d'une solution d'hydroxocobalamine à 1000 μg/ml, le dépôt de l'échantillon étant fait à la verticale du tube N° 3.

E = 900 V. aux bornes

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 12 heures.

Volume de mélange écoulé = 0,90 ml ou 450 μg de cyanocobalamine et 450 μg d'hydroxocobalamine.

De même que dans l'expérience précédente on note une séparation immédiate en trois traînées près du point d'alimentation.

Ici aussi la recherche de l'ion Cobalt a été négative dans tous les tubes.

.../...

Séparation de la cyanocobalamine.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 362 mμ	μg cyanocobalamine
6	3,81	2,9	0,003	0
7	5,08	3,1	0,005	14,57
8	6,35	4	0,648	100,80
9	7,02	3,3	1,170	207
10	8,89	3,3	0,184	30,69
11	10,16	2,6	0,004	0
12	11,43	2,5	0,004	0
				total = 353,06 μg

Séparation de l'hydroxocobalamine.

N° Tube	d/cm	V/ml	DO 351 mμ	μg hydroxocobalamine
12	11,43	2,5	0	0
13	12,7	2,7	0,010	5
14	13,97	2,3	0,016	5,06
15	15,27	2,7	0,038	8,64
16	16,51	2,9	0,101	17,11
17	17,78	2,9	0,089	15,66
18	19,05	2,8	0,268	36,4
19	20,32	2,9	0,355	48,43
20	21,59	3	0,292	42,3
21	22,86	2,7	0,347	44,28
22	24,13	2,9	0,369	50,46
23	25,4	2,8	0,273	26,96
24	26,67	2,4	0,037	7,2
25	27,94	2,6	0,010	5,2
26		2,6	0	0
				total = 322,70 μg

On recueille 78,4 % de cyanocobalamine et 71,1 % d'hydroxocobalamine.

Cette expérience a été réalisée pratiquement de la même façon que la précédente ; cependant afin de permettre une étude plus prolongée de la migration cathodique de ces complexes, l'apport de la solution à analyser a été fait au niveau du tube N° 3 dans le secteur anionique.

L'écoulement de l'électrolyte s'est révélé comme dans l'expérience précédente très correct, ce qui donne toute sa validité à l'expérience.

La migration de la cyanocobalamine est encore faible, mais il faut cependant noter qu'elle commence à s'éliminer à 5 cm du point de dépôt alors que dans les expériences précédentes elle commençait à s'éliminer à la verticale de ce point.

L'hydroxocobalamine dont la migration est plus rapide commence à s'éliminer après un parcours de 12,7 cm, au tube N° 13. Elle continue à s'éliminer jusqu'au tube N° 25, c'est-à-dire sur 15 cm. Dans l'expérience n° 6 elle ne s'éliminait que sur 12 cm, mais nous avons justement pensé que la migration était tronquée.

.../...

Les expériences n° 6 et n° 7 sont bien superposables et permettent d'affirmer que la conductivité équivalente de l'hydroxocobalamine est supérieure à celle de la cyanocobalamine. Cette constatation nous permet d'envisager la séparation électrophorétique de ces deux vitamines dans un but préparatif.

Expérience n° 8.

Nous préparons un mélange composé de 0,50 ml d'une solution de cyanocobalamine à 1000 µg/ml de 0,50 ml d'une solution d'acétate de Cobalt à 400 µg/ml. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube N° 6.

E = 900 V. aux bornes

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 10 heures.

Volume de solution écoulé : 1,50 ml ou 500 µg de cyanocobalamine, 500 µg d'hydroxocobalamine et 500 µg de Cobalt.

Le dosage de l'ion Cobalt sera effectué sur une prise d'essai égale à la totalité de l'écoulement.

Séparation des vitamines et du cobalt.

N° tube: d/cm : V/ml : DO 362 mµ: µg cyano: DO 351 mµ: µg hydroxo: DO 480 mµ: µg Cobalt :

6	0	9,5	0	0	0	0	0	0
7	1,27	9,5	0	0	0	0	0	0
8	2,54	8,5	0,006	0	0	0	0	0
9	3,81	10	0,057	25	0	0	0	0
10	5,08	7,5	0,358	130,5	0	0	0	0
11	6,35	7	0,400	149	0	0	0	0
12	7,62	6	0,210	66	0	0	0	0
13	8,89	6	0,054	13,2	0	0	0,676	4,8
14	10,16	6	0	0	0,043	20,4	0,800	17,2
15	11,43	6	0	0	0,070	27	0,826	17,8
16	12,7	6,5	0	0	0,105	39	1,880	32
17	13,97	6,5	0	0	0,152	52,65	1,560	33,6
18	15,24	8	0	0	0,169	70,4	1,840	39,6
19	16,51	5,5	0	0	0,227	61,6	1,624	35,2
20	17,78	5,5	0	0	0,160	46,2	2,220	48,6
21	19,05	7	0	0	0,080	35	0,826	17,8
22	20,32	5,5	0	0	0,026	19,8	0,784	17
23	21,59	5	0	0	0,012	10	0,684	15,2
24	22,86	5,3	0	0	0	0	0,664	14,6
25	24,13	5,2	0	0	0	0	0,676	14,8
total :				383,7 µg	total :		382,05 µg	total : 320,2 µg

On recueille 76,74 % de cyanocobalamine, 76,41 % d'hydroxocobalamine et 64,04 % des ions Cobalt.

.../...

L'expérience n° 8 a été conçue dans un esprit de synthèse des précédentes expériences en vue de vérifier une éventuelle intervention du sel de Cobalt surajouté sur la mobilité des deux vitamines.

La cyanocobalamine commence à s'éliminer à 4 cm du point de dépôt et elle migre pendant 7,5 cm.

L'hydroxocobalamine commence à s'éliminer après un parcours de 10,16 cm au tube N° 14, et ceci pendant 12,7 cm jusqu'au tube N° 23 avec des maxima aux tubes N° 17, 18, 19.

On doit noter le début d'élimination du Cobalt qui précède de 1,27 cm celui de l'hydroxocobalamine. La migration du Cobalt est régulière, elle s'étale sur 15 cm et son maximum d'écoulement est à peine décalé vers la cathode par rapport à celui de l'hydroxocobalamine.

Les expériences dans lesquelles on a confronté les migrations électrophorétiques continues des trois types de molécules cobaltiques: acétate de Cobalt, hydroxocobalamine et cyanocobalamine, permettent de différencier assez nettement l'hydroxocobalamine des deux autres molécules; elles permettent notamment d'envisager la séparation électrophorétique préparative de cette dernière. La cyanocobalamine se comporte comme une base à très faible affinité cathodique.

CONCLUSION -

Lorsque nous avons procédé à l'électrophorèse continue de solutions de cyanocobalamine et d'hydroxocobalamine, nous avons pu observer des vitesses de migration assez différentes pour ces deux types de vitamines B12. L'hydroxocobalamine a une vitesse de propagation nettement plus grande, elle paraît être en relation avec sa propriété cathionique plus accusée. Cependant les caractéristiques opérationnelles qui comportent un entraînement par l'électrolyte se traduisent par des diffusions et une répartition assez étalée dans tout le champ cathodique.

Lors de l'électrophorèse, dans les mêmes conditions, du mélange des deux vitamines, nous avons observé deux comportements assez significatifs. Etant donné les colorations très accusées de ces cations nous avons vu, à partir du point d'alimentation, deux traînées nettement distinctes au point de départ: l'une de coloration plus pourpre peu décalée par rapport à la verticale, correspond à la cyanocobalamine; l'autre plus inclinée traduit l'attraction cathodique plus forte de l'hydroxocobalamine, de plus elle présente une teinte caractéristique rose orangé due à la perte du groupement CN^- . Ces colorations ne persistaient que sur une longueur de 10 cm environ, ensuite elles étaient éluées par l'écoulement de l'électrolyte. On peut, dès lors, se demander si au cours de certaines séparations par électrophorèse continue il ne serait pas plus intéressant de limiter la hauteur d'entraînement par l'électrolyte pour les ions séparés à la fois par leur affinité cathodique et par leur vitesse de migration; il serait alors possible de diminuer les phénomènes de diffusion, et par conséquent recueillir des fractions moins mélangées.

D'autre part nous avons pu mettre en évidence au cours des électrophorèses de solutions d'hydroxocobalamine, la migration d'un pigment jaune assez rapidement évanescant et qui paraît présenter des analogies avec le produit étudié par CARDINI (7) et considéré comme une impureté. Nous percevons par là l'intérêt de la méthode pour définir la pureté de la vitamine étudiée.

VI - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE D'ALCALOIDES.

La séparation des alcaloïdes a toujours posé un problème délicat à résoudre, qu'il s'agisse d'analyses de médicaments composés ou d'expertises toxicologiques. Les méthodes chromatographiques ont souvent rendu des services inestimables (52-53) cependant, elles sont parfois inaptes à résoudre certains mélanges, c'est le cas notamment de la Strychnine et de l'Atropine, au moins sur papier simple.

Etant donné le caractère basique des alcaloïdes, on pouvait prévoir une application simple de l'électrophorèse à leur étude. Il faut citer quelques travaux :

- ceux de KARIYONE et ceux de HASCHIMOTO (32) sur quelques alcaloïdes purs,
- ceux de GRAF et LIST sur les alcaloïdes de l'opium,
- ceux de PARIS et FAUGERAS sur les alcaloïdes des génistés (19-55) et sur des alcaloïdes de séparation difficile (56).

L'électrophorèse des alcaloïdes est actuellement très employée dans la recherche toxicologique ; SANO (67) utilise pour la séparation des stupéfiants l'électrophorèse à haute tension mise au point par HEILMEYER (34). Une méthode simple sur gel d'agar-agar a été décrite par L.A. WILLIAMS (46).

Nous pouvons penser que la méthode électrophorétique continue qui permet le dosage des fractions séparées présente un intérêt tout particulier.

Nous allons étudier deux mélanges d'alcaloïdes :

- 1° le mélange sulfate d'Atropine, sulfate de Strychnine.
- 2° le mélange chlorhydrate de Cocaïne, chlorhydrate de Morphine.

Ces électrophorèses seront suivies par le dosage des bases alcaloïdiques recueillies dans les tubes collecteurs.

o

o o

1 - Mélange sulfate d'Atropine - Sulfate de strychnine.

Dosage des bases Atropine et Strychnine.

Nous utiliserons le dosage spectrophotométrique après avoir déterminé le spectre d'absorption en lumière ultra-violette de solutions de sulfate d'Atropine et de sulfate de Strychnine dans le tampon à l'acide formique à 1 g p. 1000 et pH 2,8.

- Pour le sulfate d'Atropine nous prenons le maximum à 225 millimicrons.
- Pour le sulfate de Strychnine nous prenons le maximum à 257 millimicrons.

Il est alors possible de déterminer des courbes d'étalonnage avec des solutions de ces alcaloïdes de titres connus dans le tampon à pH 2,8. A l'aide de ces courbes nous établissons deux équations qui permettent de calculer la teneur en sulfate d'Atropine et en sulfate de Strychnine de chaque fraction.

.../...

N° tube : d/cm : V/ml : DO 225 mμ : μg sulf. Atropine : DO 257 mμ : μg sulf. Strych.

15	0	2,9	0,140x5	325,5	0,140	14,21
16	1,27	2,9	0,177x5	431,5	0,243	24,07
17	2,54	2,9	0,305x2	350,5	0,146x2	30,16
18	3,81	2,8	0,266x6	668	0,321x3	98,26
19	5,08	3	0,314x6	790	0,235x6	145,8
20	6,35	2,2	0,297x6	489,5	0,325x6	245,04
21	7,62	3,2	0,306x6	681	0,361x6	238,08
22	8,89	3,3	0,300x6	659	0,383x6	259,38
23	10,16	3,6	0,322x6	796	0,421x6	309,88
24	11,43	3,2	0,387x6	818,8	0,243x12	517,92
25	12,7	3,5	0,198x12	815,5	0,304x12	679,8
26	11,97	4,2	0,230x12	978,6	0,411x12	1397,44
27	15,24	4,7	0,159x6	375	0,138x12	370,72
28	16,51	5	0,249x10	1380	0,315x10	1512
29	17,78	5	0,248x10	275	0,310x10	1484
30	19,05	6,5	0,307	256	0,197	- 256
				total = 7648,46 μg	total =	9916,92 μg

On recueille 76,4 % de sulfate de Strychnine et 99,1 % de sulfate d'Atropine.

Expérience n° 2.

Nous allons soumettre à l'électrophorèse le même mélange que dans l'expérience précédente, en utilisant le même tampon à pH 2,8. Le dépôt de l'échantillon se fait également à la verticale du tube N° 15.

E = 600 V. aux bornes.

I = 23 mA.

Durée de l'électrophorèse = 16 heures.

Volume de mélange écoulé = 3 ml ou 12 020 μg de sulfate d'Atropine et 12 000 μg de sulfate de Strychnine.

Comme précédemment la recherche des bases Atropine et Strychnine est négative dans les tubes N° 1 à N° 15.

N° Tube : d/cm : V/ml : DO 225 mμ : μg sulf. Atropine : DO 257 mμ : μg sulf. Strych

15	0	10,2	0,208	378,4	0,075	30,6
16	1,27	9,9	0,181	217	0,081	29,7
17	2,54	10,2	0,206	346	0,210	76,5
18	3,81	11	0,579	480	0,579	221,1
19	5,08	10	0,425	590	0,368x3	378
20	6,35	10	0,309x2	823	0,290x5	600
21	7,62	9,1	0,419x2	956,4	0,436x6	815,54
22	8,89	8,3	0,395x3	1213,5	0,396x9	985,04
23	10,16	7,1	0,375x3	887,5	0,236x18	1035,18
24	11,43	7,7	0,212x6	1078	0,265x18	1261,26
25	12,7	5,2	0,235x5	618,8	0,336x15	897
26	13,97	4,4	0,268x5	572	0,350x15	792
27	15,24	4	0,289x5	604	0,373x15	762
28	16,51	5,4	0,339x5	998,2	0,669x10	1247,4
29	17,78	5,5	0,450x5	1474	0,772x10	1443,75
30	19,05	4	0,317x2	608	0,144x15	500
				total : 11073,07 μg	total =	11834,8 μg

On recueille 92,10 % de sulfate de Strychnine et 98,62 % de sulfate d'Atropine.

Ces deux expériences se différencient, à la fois par la durée d'électrophorèse (7 heures pour la première et 16 heures pour la seconde) et par la variation en sens inverse du débit de la solution d'alcaloïdes (2,5 ml en 7 heures et 3 ml en 16 heures).

La première expérience à plus forte charge d'alcaloïdes et électrophorèse plus courte traduit une différence de mobilité assez marquée entre les deux bases alcaloïdiques. Les cinq premiers tubes cathodiques (à 6,35 cm du point d'écoulement) éliminent près du tiers de la base Atropine et seulement le vingtième de la Strychnine. Par contre les cinq derniers tubes cathodiques (de 13,97 à 19,05 cm) contiennent le tiers de l'Atropine et la moitié de la Strychnine.

On pourrait penser que ces phénomènes sont dûs aux propriétés typiques de ces alcaloïdes. Pour la Strychnine-base sa faible solubilité (une partie pour 6 000 parties d'eau) et sa haute basicité due aux deux azotes constitutifs limiteraient son entraînement chromatographique. Pour l'Atropine plus soluble et moins basique, elle serait éliminée de façon plus régulière.

La deuxième expérience ne contredit point ces aperçus bien qu'elle soit moins convainquante par suite de l'écoulement irrégulier de l'électrolyte et par la durée plus grande de l'électrophorèse qui permet de recueillir un pourcentage de Strychnine plus élevé.

Il n'est pas impossible que l'électrophorèse continue conduite à très haut voltage sous intensité plus forte eût permis une meilleure séparation en un temps plus court.

o

o o

2 - Mélange chlorhydrate de Morphine - Chlorhydrate de Cocaïne.

Nous allons maintenant confronter l'allure électrophorétique de deux alcaloïdes stupéfiants : la Morphine et la Cocaïne, dont la séparation par chromatographie est assez difficile par suite de leur Rf voisins.

Nous avons pensé donner à ces expériences des caractères différents en les effectuant avec des mélanges tampons de pH variables, tandis que les solutions et vitesses d'écoulement resteront les mêmes.

Expérience n° 1.

Nous préparons un mélange à parties égales de solution dans le tampon contenant 8 mg/ml de chlorhydrate de Morphine et de Cocaïne. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte utilisé est une solution d'acide Formique à 1 g p. 1000 à laquelle on ajoute une quantité suffisante d'ammoniaque pour que le pH soit égal à 6 et que l'on dilue de façon à avoir une résistivité égale à 1430 Ohms.

.../...

Dosage des différentes fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : DO 224 mμ : DO 232 mμ : μg chl.Morphine : μg chl.Cocaine

15	0	5	0,385x20	0,360x20	678,5	537,2
16	1,27	5,2	0,397x20	0,375x20	686,4	584,1
17	2,54	5,3	0,402x20	0,378x20	705,5	591,2
18	3,81	4,8	0,317x20	0,295x20	508,8	417,3
19	5,08	4,8	0,595x10	0,500x20	640	381
20	6,35	5,5	0,480x10	0,432x10	474	330
21	7,62	6	0,416x10	0,369x10	459	299,4
22	8,89	6,8	0,278x20	0,243x20	708	425,3
23	10,16	7,5	0,209x20	0,204x20	465	469,2
24	11,43	9	0,180x20	0,214x20	279	741,3
25	12,7	8,5	0,182x20	0,226x20	229	762
26	13,97	9	0,500x5	0,610x5	177,5	542
27	15,24	9	0,360x5	0,436x5	127	382
28	16,51	3,5	0,167	0,204	33,3	53,9
29	17,78	2,2	0,175	0,200	27,9	31,6
30	19,05	2,2	0,222	0,144	18,5	23,1

total = 6 217,4 μg total=6 573,6 μg

On recueille 86,35 % de chlorhydrate de Morphine et 91,2 % de chlorhydrate de Cocaine.

Expérience n° 2.

Nous étudierons le même mélange d'alcaloïdes que lors de l'expérience précédente. Le dépôt de l'échantillon est fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte utilisé est une solution de formiate d'Ammonium à pH = 7,5 et de résistivité = à 1 000 Ohms.

E = 800 V. aux bornes.

I = 20 mA.

Durée de l'électrophorèse = 8 heures.

Volume de solution écoulé = 1,50 ml ou 6 000 μg de chlorhydrate de Morphine et 6 000 μg de chlorhydrate de Cocaine.

Dosage des bases Morphine et Cocaine en solution dans le tampon à pH 7,5.

Nous établissons pour cette expérience des courbes d'étalonnage à 224 et 232 mμ avec des solutions de chlorhydrate de Cocaine et de Morphine dans le tampon à pH 7,5.

On fait les déterminations suivantes :

A 224 millimicrons.

- une solution de chlorhydrate de Cocaine à 16 μg/ml donne DO = 0,470
- une solution de chlorhydrate de Cocaine à 1 μg/ml donne DO = 0,029

- une solution de chlorhydrate de Morphine à 16 µg/ml donne DO = 0,425
- une solution de chlorhydrate de Morphine à 1 µg/ml donne DO = 0,026

Si on appelle X la teneur en chlorhydrate de Cocaine exprimée en µg/ml,
 " " " Y " " " " " " " Morphine " " "
 on a :

$$0,029 X + 0,026 Y = M = DO \text{ à } 224 \text{ m}\mu \text{ pour la solution à doser.}$$

A 234 millimicrons.

- une solution de chlorhydrate de Cocaine à 16 µg/ml donne DO = 0,650
- " " " " " " " 1 µg/ml " DO = 0,040
- une solution de chlorhydrate de Morphine à 16 µg/ml donne DO = 0,261
- " " " " " " " 1 " " DO = 0,016

On a donc : $0,040 X + 0,016 Y = N = DO \text{ à } 232 \text{ m}\mu \text{ pour la solution à doser.}$

Dosage des différentes fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : DO 224 mµ : DO 232 mµ : µg chl.Morphine : µg chl.Cocaine

15	0	7,1	0,415x5	0,430x5	205	236
16	1,27	8,2	0,316x5	0,315x5	203	184,3
17	2,54	8	0,351x10	0,330x10	465	351
18	3,81	7,9	0,382x10	0,379x10	431	430
19	5,08	7,5	0,124x20	0,224x10	306	206
20	6,35	8,6	0,219x10	0,187x10	384	172,2
21	7,62	8,4	0,248x10	0,207x10	334	174
22	8,89	11,6	0,315x10	0,259x10	583	291
23	10,16	14	0,346x10	0,309x10	910	435
24	11,43	18,4	0,258x10	0,272x10	800	591
25	12,7	17,8	0,184x10	0,215x10	282	680
26	13,97	22,5	0,099x10	0,117x10	315	471
27	15,24	21,5	0,353	0,415	100	124
28	16,51	21,5	0,173	0,186	99	6,5
29	17,78	7,5	0,192	0,162	29,3	1,27
30	19,05	3,2	0,151	0,112	13,4	0,25

total = 5 459,7 µg total:4413,52 µg

On recueille 90,9 % de chlorhydrate de Morphine et 73,5 % de chlorhydrate de Cocaine.

Expérience n° 3.

Ici encore nous étudierons le même mélange d'alcaloïdes et le dépôt de l'échantillon sera encore fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte utilisé est une solution d'acide Formique à 1 g p. 1000 dont le pH est égal à 2,8 et la résistivité à 1430 Ohms.

.../...

E = 700 V aux bornes.

I = 24 mA.

Durée de l'électrophorèse = 4 heures.

Volume de solution écoulé = 1 ml ou 4000 µg de chlorhydrate de Cocaine et de Morphine.

Dosage des bases Morphine et Cocaine en solution dans le tampon à pH 2,8.

De même pour les expériences précédentes nous établissons des courbes d'étalonnage avec des solutions de chlorhydrate de Cocaine et de Morphine de titre connu dans le tampon à pH 2,8.

On obtient les chiffres suivants :

A 224 millimicrons.

- une solution de chlorhydrate de Cocaine à 16 µg/ml donne DO = 0,450
- " " " " " " " 1 " " DO = 0,028
- une solution de chlorhydrate de Morphine à 16 µg/ml donne DO = 0,378
- une solution de chlorhydrate de Morphine à 1 µg/ml donne DO = 0,023

Si on appelle X la teneur en chlorhydrate de Cocaine exprimée en µg/ml
Si on appelle Y la teneur en chlorhydrate de Morphine exprimée en µg/ml

on a :

$$0,028 X + 0,023 Y = M = DO \text{ à } 224 \text{ m}\mu \text{ pour la solution à doser.}$$

A 232 millimicrons.

- une solution de chlorhydrate de Cocaine à 16 µg/ml donne DO = 0,625
- " " " " " " " 1 " " DO = 0,039
- une solution de chlorhydrate de Morphine à 16 µg/ml donne DO = 0,236
- " " " " " " " 1 " " DO = 0,014

on a donc : $0,039 X + 0,014 Y = N = DO \text{ à } 232 \text{ m}\mu \text{ pour la solution à doser.}$

A l'aide de ces deux équations nous pouvons calculer les teneurs en alcaloïdes de chacune des fractions.

Dosage des différentes fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : DO 224 mμ : DO 232 mμ : μg chl. Morphine : μg chl. Cocaine

15	0	4,1	0,260	0,215	24,1	8,3
16	1,27	5,1	0,535	0,365	84,6	3,06
17	2,54	5,5	0,480	0,358	72	13,2
18	3,81	6,2	0,545	0,461	75	30,4
19	5,08	5,5	0,108x10	0,105x10	111	30,4
20	6,35	7,3	0,279x10	0,282x10	350	80,2
21	7,62	7,5	0,486x10	0,510x10	570	302,9
22	8,89	8,9	0,690x10	0,718x10	990	600
23	10,16	8,7	0,515x10	0,526x10	767	980
24	11,43	10,5	0,115x10	0,162x10	335	678
25	12,7	11,5	0,185x5	0,151x5	255	367
26	13,97	11,6	0,240	0,188	72	85
27	15,24	11	0,190	0,136	58	17,4
28	16,51	11,8	0,137	0,095	45,5	8,8
29	17,78	3,8	0,290	0,217	35	4,5
30	19,05	1,8	0	0	0	0
total :					3 834,2 μg	total: 3210,16 μg

On recueille 95,85 % de chlorhydrate de Morphine et 80,22 % de chlorhydrate de Cocaine.

Les expériences n° 1 et n° 2, effectuées en milieu faiblement acide et alcalin, ne se différencient que par des vitesses de lavage variables.

Dans l'une comme dans l'autre, la Cocaine paraît migrer assez lentement et son élimination est assez régulière. Par contre en milieu légèrement acide la Morphine migre très peu, la moitié étant éliminée à 5,08 cm du point de dépôt.

L'expérience n° 3 à pH très acide 2,8 a un aspect assez différent en ce sens que la migration des deux alcaloïdes présente des maxima à peu près au même niveau.

La séparation de ces deux alcaloïdes est donc toujours difficile ; en milieu acide il semble qu'il soit impossible de les différencier. Nous n'avons pas abordé l'électrophorèse en zone très alcaline car nous savons combien dans ces conditions la Morphine s'oxyde facilement en Oxymorphine irrécupérable.

o

o o

Ayant étudié ces composés de polarité bien définie, soit isolés, soit en mélange de même polarité, nous allons maintenant aborder des mélanges de corps très différents tels que peuvent le présenter des formules utilisées en thérapeutique, par exemple le mélange : salicylate de sodium, hexaméthylènetétramine, glucose, utilisé comme antiseptique par voie intraveineuse ou intramusculaire.

.../...

VII - ETUDE DE L'ELECTROPHORESE CONTINUE DU MELANGE MEDICAMENTEUX :

SALICYLATE DE SODIUM, GLUCOSE, HEXAMETHYLENETETRAMINE.

Nous allons étudier la solution dont la composition est la suivante :

- Salicylate de Sodium 0,50 g
- Glucose 0,50 g
- Héxaméthylène-tétramine 0,50 g
- eau distillée q s p 5 ml

Nous sommes donc amenés à envisager le dosage de ces différentes fractions. Nous allons en indiquer le protocole.

o
o o

Dosage de l'Acide Salicylique.

Nous avons utilisé la méthode de KOLTHOFF (38-39), elle met à profit la formation du dérive bromé de l'acide Salicylique. Pour cela, on emploie une quantité connue de mélange bromure-bromate de Potassium en milieu acide, puis on dose l'excès n'ayant pas réagi par iodométrie. L'Iode libéré correspond au Brome non fixé, il est dosé par une solution titrée de thiosulfate de Sodium.

Réactifs

- Solution de bromate de Potassium N/10 à 16,70 g p. 1000 dans l'eau distillée.
- Bromure de Potassium cristallisé RP
- Solution d'iodure de Potassium N à 166,06 g p. 1000.
- Solution d'acide Chlorhydrique 4 N. à 146 g p. 1000.
- Solution de thiosulfate de Sodium N/10 et N/5.

1 ml de solution de thiosulfate de Sodium N/10 correspond à 0,0023 g d'acide Salicylique.

1 ml de solution de thiosulfate de Sodium N/5 correspond à 0,0046 d'acide Salicylique.

Technique.

Dans un flacon bouchant émeri on introduit :

- 10 ml de la solution à doser
- 10 ml de solution de bromate de Potassium N/10.
- 1 g de bromure de Potassium
- 2 ml de solution d'acide chlorhydrique 4 N.

On bouche le flacon et on attend de 5 à 10 minutes. On ajoute ensuite :

- 2 ml de solution normale d'iodure de Potassium.

On rebouche le flacon et on attend encore 5 minutes. On titre alors rapidement à l'aide d'une solution de thiosulfate de Sodium.

.../...

Il faut noter que cette méthode n'est pas valable pour le dosage de l'acide Salicylique en présence de Glucose.

exemple : à 2 ml d'une solution d'acide Salicylique à 1 mg/ml on ajoute 2 mg de Glucose. Pour effectuer le dosage nous avons utilisé 0,65 ml d'une solution de thiosulfate de Sodium N/5 au lieu de 0,45 ml.

En conséquence nous ne tiendrons pas compte du dosage de l'acide Salicylique dans les fractions où nous aurons noté la présence de Glucose.

Dosage du glucose.

Nous utilisons la méthode d'OST, NELSON, DORCHE (15) dont le principe est le suivant :

- réduction d'une liqueur cuprique tamponnée, au bain-marie à ébullition pendant 10 minutes.
- réoxydation par une liqueur arsénio-molybdique.
- oxydation du complexe molybdoso-molybdique par une solution titrée de permanganate de Potassium N/400.

Réactifs

a) Liqueur cuprique d'OST-DORCHE.

solution A : Carbonate de Potassium Codex	15 g
Bicarbonate de Potassium Codex	12 g
eau q s p	80 ml.

solution B : Sulfate de Cuivre cristallisé	1,40 g
eau q s p	20 ml.

On mélange les deux solutions et on agite vigoureusement.

b) Liqueur Arsénio-molybdique de NELSON-DORCHE.

solution A : Molybdate d'Ammonium cristallisé	25 g
eau distillée q s p	450 ml
acide sulfurique concentré officinal	100 ml.

On dissout complètement le molybdate dans l'eau, puis on ajoute par petites portions et en agitant la quantité d'acide sulfurique. On doit opérer lentement pour ne pas échauffer le mélange.

solution B : Arséniate de Sodium officinal	3 g
eau distillée q s p	25 ml.

On mélange les deux solutions A et B, on laisse 48 heures à l'étuve à 37°. On filtre.

c) Solution de permanganate de Potassium titrée N/4 (7,90 g p. 1000). Pour le dosage on utilise une dilution de cette solution datant de moins de 12 heures.

.../...

Technique.

a) Réduction. Dans un tube à essai on mesure :

- 2 ml de la solution à doser contenant approximativement 0,043 à 0,43 mg de Glucose.

- 1 ml de liqueur cuprique.

On mélange et on place au bain-marie bouillant pendant 10 minutes, on refroidit sous un courant d'eau puis on ajoute goutte à goutte et en agitant

- 1 ml de liqueur arsénio-molybdique.

On laisse reposer 10 à 15 minutes en agitant fréquemment.

b) Titration. On décolore exactement le complexe bleu obtenu par une solution N/400 de permanganate de Potassium.

Soit N le nombre de ml de solution utilisés :

On sait que 1 ml de solution de permanganate de Potassium N/400 correspond à 0,0436 mg de Glucose, si on appelle D la dilution on a :

$$\text{Glucose en g p. 1000} = 0,0218 \times D \times (N + 1)$$

Dosage de l'Héxaméthylène-tétramine.

Nous utilisons la méthode dans laquelle l'Héxaméthylène-tétramine est dosée à l'état d'azotate double d'argent et de formine (37 -40).

En présence d'un excès notable de nitrate d'Argent, l'Héxaméthylène-tétramine donne un précipité de nitrate double de Formine et d'Argent qui est insoluble dans l'eau. Sur la liqueur filtrée, on dose l'excès d'Argent en milieu nitrique par le sulfocyanure de Potassium, en présence d'alun ferrique.

Réactifs

- Solution de nitrate d'Argent N/10 à 16,99 g p. 1000.
- Acide nitrique pur R P.
- Solution d'alun ferrique à 10 % dans l'eau distillée.
- Solution de sulfocyanure de Potassium N/10.

Technique.

A la prise d'essai choisie contenant de 0, à 45 mg d'Hexaméthylène-tétramine on ajoute :

- 5 ml de solution de nitrate d'Argent N/10.

On filtre, sur le filtrat on dose l'excès de nitrate d'Argent par une solution titrée de sulfocyanure de Potassium N/10 en présence d'alun ferrique.

.../...

On obtient ainsi le nombre de ml de nitrate d'Argent N/10 n'ayant pas réagi. Par différence on peut calculer la quantité de nitrate d'Argent combiné sous forme de nitrate double d'Argent et de Formine.

- 1 ml de solution de nitrate d'Argent N/10 correspond à 0,00934 mg d'Héxaméthylène-tétramine.

Nous avons vérifié cette méthode à l'aide d'une solution d'Héxaméthylène-tétramine titrée.

Par contre de même que pour le dosage de l'acide Salicylique il n'est pas possible d'utiliser cette méthode lorsque nous nous trouvons en présence de Glucose.

par exemple : pour 10 mg d'Héxaméthylène-tétramine nous avons utilisé 1,15 ml de solution de nitrate d'Argent N/10, alors que pour 10 mg d'Héxaméthylène-tétramine auxquels on ajoute 10 mg de Glucose il faut seulement 0,23 ml de solution de nitrate d'Argent N/10.

Il est bien entendu que pour chaque dosage nous avons fait un témoin avec les différents électrolytes utilisés.

o
o o

Expérience n° 1.

Nous allons étudier la solution définie plus haut. Le dépôt est fait à la verticale du tube N° 15.

L'électrolyte est une solution de formiate d'Ammonium de pH 7 et de résistivité égale 1430 Ohms.

E = 600 V. aux bornes

I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 5 heures.

Volume de solution écoulé = 1 ml ou 85 mg d'acide Salicylique, 50 mg de Glucose. 100 mg d'Héxaméthylène-tétramine.

Détermination du Glucose dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml permanganate N/400 : mg Glucose

12	3,81	4	0,4 ml	0	0
13	2,54	2,6	0,4 ml	3,75	1,32
14	1,27	1,6	0,4 ml	18,50	3,4
15	0	1,6	0,2 ml	17,15	6,35
16	1,27	1,6	0,2 ml	18,10	6,65
17	2,54	1,7	0,2 ml	18	7,05
18	3,81	1,6	0,4 ml	15,3	2,85
19	5,08	1,7	0,4 ml	4,5	1,02
20	6,35	1,7	0,4 ml	0	0

total = 28,94 mg

.../...

Détermination de l'Acide Salicyclique dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml thiosulfate N/5 : mg Ac. Salicyl.

1	17,78	7,5	5 ml	0	0
2	16,51	7,9	"	0	0
3	15,24	8,6	"	0	0
4	13,97	8	"	0,45	3,32
5	12,7	6,6	"	0,65	3,95
6	11,43	4,2	3,8 ml	0,55	2,6
7	10,16	3,2	2,6 ml	0,55	3,10
8	8,89	2,4	1,5 ml	0,35	2,58
9	7,62	2,8	2,4 ml	0,45	2,42
10	6,35	2,6	2 ml	0,30	1,80
11	5,08	3,8	2 ml	0,40	3,50
12	3,81	4	2 ml	0,45	4,14
					total = 27,41 mg

Détermination de l'Hexaméthylène-tétramine dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml nitr. Argent N/10 : mg Urotropine

20	6,35	1,7	1 ml	0,50	7,90
21	7,62	2,3	2,1 ml	1,20	12,20
22	8,89	3,2	3 ml	1,40	13,90
23	10,16	3,6	3 ml	1,60	17,90
24	11,43	4,8	4 ml	0,50	5,60
25	12,7	6,4	4 ml	0	0
					total : 57,5 mg

On recueille 57,8 % du Glucose, 32,2 % de l'Acide Salicylique et 57,5 % de l'Héxaméthylène-tétramine.

Expérience n° 2.

Nous utilisons toujours la même solution, le dépôt étant fait à la verticale du tube N° 15.

La solution d'électrolyte est encore le tampon au formiate d'Ammonium à pH 7 et de résistivité égale à 1430 Ohms.

E = 600 V. aux bornes. I = 25 mA.

Durée de l'électrophorèse = 10 heures.

Volume de solution écoulé = 1,30 ml ou 111 mg d'acide Salicylique, 65 mg de Glucose et 130 mg d'Héxaméthylène-tétramine.

Détermination du Glucose dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml permanganate N/400 : mg Glucose

12	3,81	6	0,2 ml	0	0
13	2,54	5,8	0,2 ml	2,75	4,6
14	1,27	5,8	0,2 ml	6,55	9,5
15	0	5,8	0,2 ml	11,45	15,7
16	1,27	5,9	0,2 ml	11,65	16,3
17	2,54	5,9	0,2 ml	5,35	8,1
18	3,81	6	0,2 ml	0,75	2,3
19	5,08	6	0,4 ml	0	0
total :					56,5 mg

Détermination de l'acide Salicylique dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml thiosulfate N/10 : mg Aci.Salicylique

3	15,24	6,5	4 ml	0	0
4	13,97	6,5	"	2,4	9
5	12,7	6,3	"	2,6	9,4
6	11,43	6,3	"	3,8	13,7
7	10,16	6,2	"	4,5	16
8	8,89	6	"	4,1	14,2
9	7,62	6	"	3,5	12,1
10	6,35	6,1	"	3	10,3
11	5,08	6	"	2,5	8,6
12	3,81	6	"	1,4	4,8
total =					97,10 mg

Détermination de l'Héxaméthylène-tétramine dans les fractions séparées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml nit. Argent N/10 : mg Urotropine

19	5,08	6	4 ml	1,3	18,1
20	6,35	6	"	1,3	18,1
21	7,62	6	"	1	14
22	8,89	6,1	"	0,80	11,09
23	10,16	6,1	"	0,60	8,4
24	11,43	6,1	"	0,40	5,5
25	12,7	6,3	"	0,30	4,4
26	13,97	6,4	"	0	0
27	15,24	6,3	"	0	0
total =					79,5 mg

On recueille 86,9 % de Glucose, 87,4 % d'Acide Salicylique et 61,3 % d'Héxaméthylène-tétramine.

Expérience n° 3.

Pour cette expérience nous utilisons toujours la même solution et nous faisons le dépôt de l'échantillon cette fois encore en face du tube N° 15.

.../...

Par contre nous allons adopter un tampon à pH légèrement alcalin. Il correspond à une solution de formiate d'Ammonium à pH 8,6 et de résistivité = 1430 Ohms.

E = 600 V. aux bornes

I = 23 mA.

Durée de l'électrophorèse = 6 heures.

Volume de solution écoulé = 0,90 ml ou 76,5 mg d'acide Salicylique, 90 mg d'Héxaméthylène-tétramine et 45 mg de Glucose.

Détermination de Glucose dans les fractions isolées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml Permanganate N/400 : mg Glucose

12	3,81	5	0,2 ml	0	0
13	2,54	4,1	"	1,30	2,05
14	1,27	4,6	"	2,45	3,45
15	0	4	"	12,30	11,6
16	1,27	4,2	"	10,95	10,9
17	2,54	4,4	"	8,65	9,24
18	3,81	4,6	"	2,70	3,68
19	5,08	5,8	"	0	0
total =					40,92 mg

Détermination de l'acide Salicylique dans les fractions isolées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml Thiosulfate N/10 : mg Aci.Salicylique

1	17,78	4,6	1 ml	1,70	18
2	16,51	2,8	"	0,70	4,48
3	15,24	3	"	0,40	2,76
4	13,97	2,8	"	0,60	3,86
5	12,7	3,6	"	0,50	4,14
6	11,43	3,8	"	0,45	3,94
7	10,16	4,8	"	0,40	4,50
8	8,89	4,5	"	0,40	4,22
9	7,62	4,5	"	0,30	3,10
10	6,35	4,5	"	0,20	2,07
11	5,08	4,3	"	0,15	1,46
12	3,81	5	"	0,10	1,15
total :					53,64 mg

Détermination de l'Héxaméthylène-tétramine dans les fractions isolées.

N° tube : d/cm : V/ml : prise d'essai : ml Nit. Argent N/10 : mg Urotropine

19	5,08	4,8	4 ml	1,5	16,8
20	6,35	5	"	1	11,5
21	7,62	3,8	3 ml	0,80	9,38
22	8,89	4,2	4 ml	0,50	4,70
23	10,16	3,6	3,5 ml	0,20	1,88
24	11,43	3,2	3 ml	0,10	1
25	12,7	3	2 ml	0	0
26	13,97	4	3 ml	0	0

total = 45,26 mg

On recueille 90,9 % de Glucose, 70,10 % d'Acide Salicylique, et 50,29 % d'Héxaméthylène-tétramine.

Conclusions.

Ces expériences faites avec la solution d'Héxaméthylène-tétramine, Glucose, Salicylate de Sodium sont assez révélatrices de l'ensemble des phénomènes qui se passent au cours de l'électrophorèse. A priori on pourrait penser que le Glucose, électriquement neutre, devrait être éliminé à la verticale du tube N° 15, tube d'alimentation ; en fait l'expérience montre une certaine dispersion autour de ce tube N° 15, qui évidemment donne à penser à un phénomène de diffusion et laisse induire qu'un pareil phénomène puisse se produire pour d'autres substances à faible charge électrique.

On note la lenteur de migration de l'Acide Salicylique qui s'étale sur presque la totalité des tubes du secteur anionique, avec cependant un déplacement plus accusé à 10,16 cm du point d'écoulement.

L'Héxaméthylène-tétramine a une migration très lente qui explique son entraînement massif dans le premier tiers des tubes cathodiques.

On conçoit qu'il est possible de séparer l'Héxaméthylène-tétramine et l'Acide Salicylique par électrophorèse continue, mais la dispersion de la répartition enlève beaucoup d'intérêt à cette méthode analytique. Il ne semble pas qu'il existe une association chimique entre ces deux corps bien que l'on sache la facilité avec laquelle l'Acide Salicylique donne des combinaisons moléculaires.

Lorsqu'on opère à un pH légèrement alcalin (pH 8,6 dans l'expérience n° 3) on n'obtient pas de variation pour la migration du Glucose ; par contre pour l'Acide Salicylique la migration est plus rapide, il atteint le tube N° 1, le plus proche de l'anode, où sa concentration est maximale. Ainsi paraît se révéler nettement l'influence du pH alcalin. Bien que moins accusée, la différence de comportement de l'Héxaméthylène-tétramine peut être interprétée comme un ralentissement de migration en milieu alcalin.

o

o o

.../...

Troisième Partie

DISCUSSION

Au terme de ces travaux personnels nous avons voulu confronter les résultats que nous avons obtenus avec ceux fournis par la littérature à propos des électrophorèses continues.

L'intérêt suscité par l'électrophorèse continue réalisée à des fins :

- soit de définition de mélanges de molécules,
 - soit davantage à des fins de préparation: séparation des protéines et des amino-acides^{et} des enzymes par exemple (11-29-30-44-54-73) dont on a envisagé l'introduction en toxicologie, nous a incité à étudier le comportement de quelques constituants bien définis tels que :
- 1 - des sels simples , Acétate de Cobalt, Sulfate de Cuivre.
 - 2 - "l'Emétique", combinaison d'un ordre peut être encore discuté.
 - 3 - les complexes particuliers que sont les chélates de l'EDTA.
 - 4 - les complexes que sont les vitamines B₁₂.
 - 5 - des mélanges d'alcaloïdes tels que le mélange Atropine-Strychnine et le mélange Morphine-Cocaïne.
 - 6 - enfin le mélange thérapeutique contenant du salicylate de Sodium, du Glucose et de l'Héxaméthylène-tétramine.

Il nous faut rappeler les difficultés que nous avons rencontrées pour mettre l'appareil au point.

Etant donné qu'aucun système réfrigérant n'était prévu pour éliminer le dégagement de chaleur important, nous avons été obligés d'utiliser des courants de faible intensité (25 mA) bien que la différence de potentiel puisse atteindre 20 V/cm. En conséquence nous avons été amenés à choisir des tampons très dilués pour que leurs forces ioniques soient faibles.

N'ayant jamais pu aborder les séparations à très forte intensité, nos possibilités étaient ainsi très limitées. Sachant que deux fractions seront d'autant mieux séparées que leur mobilité sera grande et que l'intensité du champ sera forte, il aurait été intéressant de pouvoir comparer deux électrophorèses d'un même produit l'une à faible, l'autre à forte intensité (alcaloïdes par exemple). Dans ce dernier cas il aurait pu être possible d'obtenir chaque fraction séparément, et non des mélanges de fractions comme nous l'avons obtenu le plus souvent.

Il faut signaler ici que la plus grande partie des électrophorèses décrites dans les travaux scientifiques ont été réalisées avec des appareils permettant d'obtenir un champ électrique de 100 mA et même plus élevé.

Pour obtenir une imbibition homogène de la feuille en abaissant sa tension de vapeur, DURRUM en 1951 ajoutait du propylène glycol à l'électrolyte lors de la séparation des protéines du sérum. Nous avons songé à ajouter à l'électrolyte une substance tensio-active. Avec l'alkylaryl sulfonate de sodium à 40 mg p.1000

.../...

nous avons obtenu une augmentation de l'écoulement égale à 40 % ; cependant à cette dose le détergent apportait une modification trop importante de la force ionique et nous avons dû renoncer à son utilisation. Simplement nous avons modifié localement l'imbibition en superposant des feuilles de papier filtre.

Pour la mise au point de l'appareil nous avons pensé étudier le comportement électrophorétique de substances colorées dont la migration est facile à suivre sur la feuille de papier. Cependant, après quelques essais nous avons constaté que certaines matières colorantes comme le bleu de méthylène sont très fortement adsorbées sur la feuille ; non seulement l'écoulement est très ralenti, mais il est pratiquement impossible de les éluer complètement.

Il est possible d'utiliser des indicateurs de pH dont la révélation est facile surtout lorsqu'on utilise l'électrophorèse en spot (STRAIN en 1951). En fait nous nous sommes servi du sulfate de Quinine qui est fluorescent en lumière ultra-violette ; sa migration est facile à suivre et il n'est pas adsorbé trop fortement.

Nous avons étudié le comportement de l'acétate de Cobalt et du sulfate de Cuivre à l'électrophorèse continue déjà décrit par STRAIN et SULLIVAN en 1951 (74).

Ces auteurs ont soumis l'ion Cuivre à l'électrophorèse continue dite de collecte, en association avec d'autres ions tels que l'Argent, le Nickel et le Fer. En milieu acide (acide lactique 0,1 M) à 200 V et 80 mA le Cuivre déposé près de l'anode se déplace vers la cathode et s'élue à peu près à mi-chemin entre les deux électrodes. En milieu alcalin (ammoniacal 4 M) à 160 V et une intensité supérieure à 100 mA, le Cuivre déposé à mi-chemin entre les deux électrodes se déplace en direction de l'anode sans l'atteindre. Le Cuivre est ici sous forme de complexe aminé, il se comporte comme un anion.

Lors de l'électrophorèse en spot STRAIN et SULLIVAN obtiennent des migrations comparables en milieu acide et ammoniacal en employant des intensités de 100 mA.

Avec un électrolyte à pH acide 4,2 nous avons obtenu le déplacement des ions Cuivre en direction de la cathode. Cependant il faut signaler un étalement assez important (sur 4 et 5 tubes).

Pour l'ion Cobalt STRAIN et SULLIVAN ont adopté l'électrophorèse en spot en utilisant comme solution tampon le tartrate d'ammonium 0,01 M à 160 V et 100 mA. Déposé près de l'anode le Cobalt ne se déplace pratiquement pas en direction de la cathode. A vrai dire, en présence de tartrate d'ammonium le sel de Cobalt ne se trouve plus sous forme de sel simple mais sous forme de complexe tartrique. Les tartrates simples des métaux comme Fer, Nickel, Cobalt ne sont pas des sels normaux, leur conductibilité très faible indique que dans ces corps une partie, au moins, du métal n'est pas ionisé (48).

Nous avons utilisé un électrolyte acide, pH 2,8 (acide formique à 1 g p. 1000) et nous avons obtenu un déplacement des ions Cobalt assez marqué en direction de la cathode et une répartition dans un assez grand nombre de tubes.

L'électrophorèse continue de "l'Emétique" n'a pas été, à notre connaissance, abordée.

A pH acide 2,8 nous avons obtenu le fractionnement d'une partie de l'antimoniotartrate acide de Potassium en acide Tartrique et Antimoine. L'acide tartrique se déplace en direction de l'anode et l'ion antimoine en direction de la cathode. Nous pouvons comparer les résultats que nous avons obtenus pour l'Antimoine avec ceux de STRAIN et SULLIVAN pour le chlorure d'Antimoine (74) : à pH acide (le tampon est une solution 0,02 M acide lactique + 0,02 M acide tartrique + 0,04 M 2 L.alanine) à 300 V et 95 mA le chlorure d'Antimoine étant déposé dans la partie médiane du champ électrique, ils obtiennent un déplacement faible en direction de l'anode. Il faut cependant noter que cet électrolyte contient de l'acide Tartrique et de la 2L.Alanine ; l'Antimoine au niveau de la feuille de papier entre en combinaison avec l'électrolyte pour former un complexe qui migre comme un anion.

Dans le cas de notre expérience nous avons envisagé l'existence possible de deux formules d'Emétique, chacune correspondant à des liaisons différentes pour l'acide Tartrique et pour l'Antimoine.

Nous avons abordé l'étude des chélates de l'EDTA avec le Calcium et le Cuivre.

L'EDTA avait déjà été utilisé par STRAIN et SULLIVAN (74) lors de l'électrophorèse continue d'un mélange d'Argent et de Nickel. Ces deux cations inséparables en milieu ammoniacal sont nettement différenciés lorsqu'on ajoute de l'EDTA à la solution d'électrolyte. On pourrait penser que le complexe argentamine formé a dû être déplacé par l'EDTA avec formation de chélate d'Argent qui subit plus facilement l'électrolyse.

Nous avons obtenu le décrochement du métal complexé à l'intérieur de la molécule et la migration de chacun des deux ions séparés suivant sa mobilité et son affinité. Nous assistons d'une part à la migration de l'ion EDTA en direction de l'anode tandis que le Calcium et le Cuivre se dirige vers la cathode. Le Calcium de mobilité plus faible que le Cuivre se cantonne dans la partie centrale de la zone cathodique tandis que le Cuivre migre très près de la cathode.

Il apparaît donc que ces chélates de Calcium et de Cuivre se comportent à la façon de sels simples et cette constatation mérite d'être soulignée lorsqu'on sait l'aptitude du Cuivre à entrer dans des complexes.

Il faut noter la différence entre ces chélates et l'émétique précédemment étudié. Tout le Calcium et tout le Cuivre sont ionisés sous l'influence du champ électrique alors que dans l'émétique une partie seulement est dissociée en deux ions antimoine et acide tartrique.

L'étude des complexes Cobaltiques que sont les vitamines B 12 à l'aide de l'électrophorèse de zone a déjà été envisagée par plusieurs auteurs (12-65). En milieu acide acétique l'hydroxocobalamine migre plus rapidement vers la cathode que la cyanocobalamine qui demeure sensiblement au point de dépôt.

En étudiant ces deux vitamines séparément et en mélange, à l'aide de l'électrophorèse continue nous avons fait les mêmes constatations. Leur vitesse de migration est assez différente ; l'hydroxocobalamine a une vitesse de propa-

gation nettement plus grande, ses propriétés cathioniques sont nettement plus accusées. Cependant du fait de l'entraînement par un électrolyte la répartition est assez étalée dans tout le champ cathodique.

Dans aucun cas nous avons obtenu la séparation de l'ion Cobalt. Certains auteurs (1) avaient déjà soumis les produits d'hydrolyse alcaline et acide de la vitamine B 12 à l'électrophorèse. Quelles que soient les conditions hydrolytiques, ils n'ont jamais pu obtenir la libération de l'ion Cobalt et la coloration rouge des pigments a toujours persisté. Il est par contre possible d'isoler électrophorétiquement à partir des produits d'hydrolyse le 5-6 diméthyl-benzimidazol nucléotide de coloration rouge orangée.

Au cours des électrophorèses à pH acide 2,8 nous avons assisté au phénomène suivant : au point de dépôt de l'échantillon et sur une longueur de papier égale à 5 ou 6 cm on perçoit la coloration des fractions (une traînée pourpre pour la cyanocobalamine, une traînée orangée pour l'hydroxocobalamine et une traînée jaune qui correspond sans doute à des impuretés (7) ; ensuite les colorations disparaissent car les fractions se trouvent diluées dans l'électrolyte. Il serait possible d'obtenir des fractions plus concentrées et moins souillées si on limitait la hauteur de la feuille ou si on pratiquait l'électrophorèse en spot suivie d'une élution des taches.

Grâce à l'électrophorèse continue, il est possible de déterminer le degré de pureté des solutions et ainsi de séparer les impuretés mises en évidence. Nous voyons ici l'intérêt préparatif de cette méthode.

L'étude électrophorétique de mélanges d'alcaloïdes est une méthode que l'on applique de plus en plus actuellement. De nombreux travaux en font foi.

Il faut rappeler que l'électrophorèse est très appréciable pour résoudre les problèmes que présentent les mélanges d'alcaloïdes. La chromatographie a rendu de grands services mais trop d'alcaloïdes possèdent des Rf voisins et leur séparation est alors difficile. Dans ce cas l'électrophorèse à haute tension donne de bons résultats surtout dans l'expertise toxicologique où l'on a besoin de résultats rapides.

Nous avons cité les travaux de HASCHIMOTO (32), de PARIS et FAUGERAS, (56) ceux de SANO (67) et de WILLIAMS (46). Ces auteurs utilisent soit l'électrophorèse de zone sur papier soit l'électrophorèse sur gel d'agar-agar. L'intensité du champ électrique peut varier de 40 à 100 et même 125 mA.

Ainsi que le signale PEETERS (63) l'électrophorèse continue semble posséder de grandes possibilités de séparation et de ce fait présente un très gros intérêt en analyse toxicologique. Cependant GOLDBAUM (22) signale que, pour le moment, elle ne semble pas encore avoir été utilisée en toxicologie.

Nous avons étudié deux mélanges d'alcaloïdes, les mélanges Atropine-Strychnine et Morphine-Cocaine. Pour ces deux mélanges, on note de légères différences de mobilité mais il est impossible de les séparer. Chaque tube contient un mélange des deux bases.

Rappelons ici que nous avons été très limité dans nos expériences par les possibilités de l'appareil. Nous avons regretté de ne pouvoir utiliser une plus forte intensité.

Enfin, nous avons soumis à l'électrophorèse continue un mélange médicamenteux comprenant du salicylate de Sodium, du Glucose et de l'Héxaméthylène-tétramine.

A pH neutre ou alcalin 8,6 l'Acide Salicylique se dirige vers l'anode et l'Héxaméthylène-tétramine vers la cathode. Les fractions sont très dispersées dans presque tous les tubes de chaque secteur ce qui enlève beaucoup d'intérêt à cette méthode analytique.

Cette expérience est très révélatrice de certains phénomènes qui se produisent au cours des électrophorèses continues. Le Glucose, substance électriquement neutre, devrait être éliminé à la verticale du point d'alimentation sans déplacement ni en direction de l'anode ni en direction de la cathode. En fait l'expérience montre une dispersion du Glucose dans les tubes environnant le tube correspondant à l'alimentation. Il se produit un phénomène de diffusion dû au flux d'électrolytes et un étalement en éventail de la substance. Il en est de même pour toute fraction isolée, elle ne se trouve pas concentrée en un seul tube mais elle est répartie dans un nombre de tubes plus ou moins grand suivant sa mobilité.

Au terme de ce travail qui nous avait captivé par son intérêt analytique nous concevons mieux les difficultés d'une telle méthode qui demande notamment un appareillage assez exceptionnel. Il est nécessaire de disposer d'un champ électrique puissant associé à une réfrigération efficace susceptible d'annuler l'évaporation par effet Joule, et aussi de régler d'une façon plus précise l'écoulement du fluide électrolytique ainsi que la composante verticale de la migration.

Cette méthode nous paraît apte à définir la constitution de certains complexes ou association moléculaire. Elle se révélerait très probablement d'un précieux secours en chimie et davantage en biologie.

o

o o

.../...

CONCLUSIONS

Le grand intérêt présenté par l'électrophorèse continue dans les travaux de laboratoire nous a incité à étudier le comportement de quelques corps simples et de quelques complexes en vue d'une éventuelle adaptation à l'analyse de mélanges pharmaceutiques. Nos recherches après adaptation de l'appareil SHANDON (20 V/cm, 24 mA, électrolyte : acide formique + ammoniacque) nous ont conduit aux conclusions suivantes :

1 - Lors de l'électrophorèse de sels simples comme l'acétate de Cobalt et le sulfate de Cuivre à pH 2,8 et 4,2, la migration des ions Cuivre et Cobalt traduit assez nettement les différences de mobilité de chacun de ces ions. Ces expériences nous ont montré le rôle important de la vitesse d'écoulement de l'électrolyte qui doit être réglée dans chaque cas en fonction de la vitesse de migration des ions.

2 - Le complexe qu'est l'antimoniotartrate acide de Potassium ou "Emétique" se comporte de la façon suivante à pH 2,8 : une certaine quantité d'Emétique est dissocié en ions acide Tartrique et Antimoine tandis que l'autre partie demeure indissociée et est entraînée dans la zone centrale faiblement anionique. Ceci apporte un argument nouveau à la thèse de l'existence de formules différentes pour les Emétiques ; l'un serait facilement décomposé sous l'influence du champ électrique tandis que l'autre, plus stable, serait susceptible de migrer lentement vers l'anode.

3 - Nous avons étudié l'électrophorèse continue de deux chélates de l'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA) : le chélate EDTA + Calcium et le chélate EDTA + Cuivre à des pH 3,4 et 4,2. Nous avons constaté la dissociation totale de ces chélates en deux ions, d'une part l'anion EDTA et d'autre part les cations Cuivre et Calcium. Le Cuivre séparé se comporte de la même façon que lors de l'électrophorèse du sulfate de Cuivre.

4 - Nous avons procédé à l'électrophorèse à pH 2,8 des complexes très particuliers que sont les vitamines B 12 : Cyanocobalamine et Hydroxocobalamine isolées ou en mélange. L'Hydroxocobalamine se distingue de la Cyanocobalamine par un caractère cathionique plus accusé et une vitesse de migration plus grande.

Dans aucun cas ne se produit la libération de l'ion Cobalt complexé à l'intérieur de ces molécules.

Cette méthode électrophorétique continue permet d'apprécier la pureté ou les transformations subies par les vitamines.

5 - Etant donné les problèmes que posent les séparations d'alcaloïdes nous avons essayé d'utiliser cette méthode électrophorétique pour séparer des mélanges d'alcaloïdes, en particulier le mélange Atropine-Strychnine à pH 2,8 et le mélange Morphine-Cocaïne à pH 6, 7,5 et 2,8.

Il nous a été impossible d'obtenir une séparation satisfaisante de chaque base alcaloïdique, ces alcaloïdes possédant des mobilités très voisines et étant entraînés dans un grand nombre de tubes du champ cathodique.

6 - Enfin nous avons appliqué cette méthode d'analyse à la séparation d'un mélange médicamenteux : salicylate de Sodium, glucose, hexaméthylène-tétramine.

Chaque fraction constituante s'oriente dans le champ électrique mais on ne peut l'obtenir isolée ; il se produit toujours un phénomène de diffusion qui étale chaque fraction sur un grand nombre de tubes.

7 - Notre travail effectué avec des molécules en solution vraie de mobilités variables, allant des sels simples aux chélates et aux complexes parfaits, laisse apparaître les difficultés techniques que présente une séparation satisfaisante des constituants, et notamment la nécessité de graduations plus intenses pour le champ électrique.

Cependant à la lumière des résultats que nous avons obtenus on peut envisager des séparations de mélanges de molécules inertes ou peu polaires et de molécules à migration plus rapide, telles qu'elles peuvent se présenter dans des préparations pharmaceutiques où lors de dégradation de molécules peu stables.

Le Président de la Thèse :

René Chambry

VU et permis d'imprimer

LYON, le 11 MAI 1964

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

P. Louis

P. LOUIS.

VU, le Doyen :

Maunuluy

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ARMITAGE J.B., CANNON J.R., JOHNSON A.W., PARKER L.F.J., LESTERSMITH E., STAFFORD W.H., TODD A.R.
Chemistry of the Vitamin B₁₂ group. The course of hydrolytic dégradation.
J. Chem. Soc. 1953, 4, 3849.
- 2 - AUDUBERT R. - Electrolyse. Presse Universitaire de France. Paris 1953, p. 6-8.
- 3 - BALDWIN R.R., LOWRY J.R., HARRINGTON R.V. - The failure of cristalline Vitamin B₁₂ to exchange with Co⁶⁰ in acidic and neutral aqueous solutions.
J. Amer. ¹²Chem. Soc. 1951, 4, 73, 4968.
- 4 - BLOCK R.J., DURRUM E.L., ZWEIG G. - A manual of Paper Chromatography and Paper Electrophorésis. Academic. Press. - New-York. 1955.
- 5 - BONNET R., CANNON J.R., JOHNSON A.W., SUTHERLAND I., TODD A.R. - The Structure of Vitamin B₁₂ and its hexacarboxylic acid degradation product.
Nature. 1955, 176, 328-330.
- 6 - CANNON J.R., JOHNSON A.W., TODD A.R. - A cristalline nucléotide free degradation product of vitamin B₁₂. Nature. 1954, 174, 1168-70.
- 7 - CARDINI C., CAVINA G., CINGOLANI E., MARIANI A., VICARI C. - Studio spettrofotometrico e chromatografico sull'idrossocobalamina. Il Farmaco (Prat). 1962, XVII, 591.
- 8 - CHAPMAN D. - The infrared spectra of EDTA and its tetrasodium salts. J. Chem. Soc - 1955, 2, 1766.
- 9 - CHARLOT G., BEZIER D. - Dosage colorimétrique du Cuivre par le diéthyl-dithiocarbamate de sodium. Analyse quantitative minérale - 3e éd. Masson - Paris 1955 - p. 512.
- 10 - CHARLOT G., BEZIER D. - Dosage colorimétrique du Cobalt par l'alpha-nitrosobéta-naphtol - Analyse quantitative minérale - 3e édit. Masson - Paris 1955 - p. 502.
- 11 - DAVIS D.R., BUD R.E. - Continuous électrophoresis - Quantitative fractionnement of serum proteins - J. Lab. Clin. Méd. 1959, 53, 6.
- 12 - DELGA J., HAZARD J. - Nouvelle forme d'administration de la vitamine B₁₂ : l'hydroxocobalamine - Presse Méd. 1963, 71, 4, 177.
- 13 - DI CASTRO G., SAN MARCO M. - Continuous électrophoresis on paper - J. Chem. Soc.- 1954, 4, 4157.
- 14 - DI CASTRO G. - Zone électrophoresis - Bull. Soc. Chim. Belgique 1956, 65, 97.
- 15 - DORCHE J., MATHIAN P., AVANTURIER G. - Les liqueurs cupri-carbonatées minérales - Leur application en dosage des sucres réducteurs - Lyon Pharm. 1951, 5, 139-154.

- 16 - DURRUM E.L. - Continuous Electrophoresis and Ionophoresis on Filter-paper. J. Amer. Chem. Soc. 1951, 73, 4875.
- 17 - DURRUM E.L. - A micro-electrophoretic and micro-ionophoretic technique. J. Amer. Chem. Soc. 1950, 72, 2943.
- 18 - EVAN W., CHESNEY M.C. - Colorimetric micromethod for determination of Antimony in biological materials. Ind. Eng. Chem. Anal. ed. 1946, 18, 146.
- 19 - FAUGERAS G. - Contribution à l'étude des alcaloïdes et des flavonoïdes chez quelques gémistes indigènes à l'aide de l'électrophorèse. Thèse de Pharmacie - Paris 1958 N° 63.
- 20 - FURTH O., HERMANN H. - Farbe Reaktionen der Weinsäure, Citronensäure und Aconitsäure - Biochem. Z. 1935, 280, 448-457.
- 21 - GALLI A., LELUC R. - Qu'est-ce que l'électrophorèse ? Prod. Pharm. 1960, 15, N° 9, 444-447.
- 22 - GOLDBAUM L. CP Stewart A. Stolman "Toxicology". Academic Press. 1960, 1, 380.
- 23 - GRASSMAN W. - Tagung der Physiologen und physiologischen Chemiker in Göttingen vom 31. August 1949 - Angew. Chem. 1950, 62, 170.
- 24 - GRASSMAN W., HANNING K. - Trennung von Stoffgemischen auf Filtrierpapier durch Ablenkung im elektrischen Feld. Z. - Physiol. Chem. 1953, 292, 32.
- 25 - GRASSMAN W., Neue Verfahren der Elektrophorese auf dem Eiweißgebiet. Naturwiss. 1951, 38, 200.
- 26 - GRASSMAN W., HANNING K., PLOCKL M. - Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Eiweißhydrolysaten durch Kombination von Elektrophorese und Chromatographie. Z. Chem. 1955, 299, 258.
- 27 - GRASSMAN W., HANNING K., ENDRES H., RIEDEL A. - Zur Bindungsweise des Prolins und Hydroxyprolins. Z. Physiol. Chem. 1956, 306, 123.
- 28 - GRASSMAN W., STROBEL R., HANNING K., DEFFNER-PLOCKL M. - Zur Konstitution des Insulins. Z. Physiol. Chem. 1956, 305, 21-23.
- 29 - GRASSMAN W., HANNING K., SCHLEYER M. - Versuche zur elektrophoretischen Reinigung von Trypsin. Z. Physiol. Chem. 1959, 316, 71.
- 30 - GROSS D. - Two dimensional high voltage paper electrophoresis of amino-acids and other organic acids. Nature - 1959, 184, 1298-1300.
- 31 - HANNING K. - Die präparative kontinuierliche Ablenkungselektrophorese "Protides of the Biological Fluids - Proceedings of the Fifth Colloquium - Bruges" Elsevier, Amsterdam, 1957 - p. 10-16.
- 32 - HASHIMOTO Y., MORI I., KIMURA M. - Paper electromigration of flavonoids and sugar with a high constant-voltage current - Nature. 1952, 170, 975-976.

- 33 - HAUGAARD G., KRONER T.D. - U.S. Patent N° 2 555 487 - 27 feb. 1948.
- 34 - HEILMEYER L., CLOTTEN R., SANO I., STURM A., LIPP A. - Analyse des Restickstoffes mit Hilfe des Hochspannungssphero-gramms. Klin. Wschr - 1954, 32, 831-837.
- 35 - HOLDSWORTH E.S. - An apparatus for continuous electrophoresis ou paper. Biochem. Z. 1955, 59, 340.
- 36 - JEAN M. - Dosage colorimétrique du Cuivre dans les aciers. Bull. Soc. Chim. France 1945, 12, 437.
- 37 - KAGANOVA F.I., SCHULMANN A.A. - Contribution au dosage de l'urotropine dans les mélanges de médicaments. Chimie et Industrie - 1941, 45, 156.
- 38 - KOLTHOFF I.M. - La substitution par le brome dans l'acide salicylique. Chimie et Industrie - 1933, 30, 282.
- 39 - LEBEAU P., COURTOIS G. - Dosage de l'acide salicylique. Traité de Pharmacie chimique - Edit. Masson - Paris 1946, 2, 1487.
- 40 - LEBEAU P., COURTOIS G. - Dosage argentimétrique de l'hexaméthylène-tétramine à l'état d'azotate double d'Argent et de Formine - Traité de Pharmacie chimique - Edit. Masson Paris - 1946, 3, 1648-1649.
- 41 - LEBEAU P., JANOT M.M. - Tartrates et Emétiques - Traité de Pharmacie Chimique - 4e Edit. Masson Paris - 1955-1956, 2, 562-564.
- 42 - LEWIS I. - "Valence and structure of atoms and molecules". The Chemical Catalog Company, Inc, New-Yord, 1923.
- 43 - LEY H. - Uber inneremetall. - Komplexsalze. Z. Elektrochem. 1904, 10, 954.
- 44 - LADD I.N., HOGENKAMP H.P.C., BARKER H.A. - Structure of Cobamide Coenzymes. Influence of pH on Absorption-spectra and ionophoretic mobilities. J. Biol. Chem. 1961, 236, 2114-2118.
- 45 - LOISELEUR J. - Techniques de Laboratoire - Chimie physique, biologique et clinique - Edit. Masson - Paris 1947 p. 112.
- 46 - LOUIS A. WILLIAMS., BRUSOCK Y.M., ZAK B. - - Rapid electrophoresis of alkaloids - Anal chem. 1960, 32, 1883-1885.
- 47 - MARIER J.R., BOULET M. - Direct determination of citric acid in milk with improved pyridin, acetic anhydrid method. J. of Dairy Sc. 1958, 41, 1683-1692.
- 48 - MATHIEU J.P. - Composés tartriques de quelques métaux bivalents. Bull. Soc. Chim. France - 1934, 1, 1713-1743.
- 49 - MARTELL A.C., CALVIN M. - Chemistry of the metal chelates compounds - Prantice Hall - In 1952.

- 50 - MORETTE A. - Organochimie et Biochimie des oligo-éléments de transition en hydrologie - Rev. Gen. Sci. Pures Appl. 1963, LXX N° 11-12, 329-331.
- 51 - MORGAN G.T., DREW H.D.K. - Researches on residual affinity and coordination - J. Chem. Soc. 1920, 117, 1456.
- 52 - MUNIER R., MACHEBOEUF M., CHERRIER N. - Microchromatographie des alcaloïdes et des bases azotées biologiques sur papier traité préalablement par des sels. Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, 204.
- 53 - MUNIER R., MACHEBOEUF M. - Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 1144.
- 54 - NAKAMURA S., TAKEO K., KATUNO A., TOMINAGA S. - Application of the two dimensional technique to the "Crossing" electrophoresis of immunological réactions. Clin. Chim. Acta 1959, 4, 893-900.
- 55 - PARIS R., FAUGERAS G. - Application de l'électrophorèse à la séparation des alcaloïdes et des dérivés flavoniques chez quelques légumineuses. Ann.Pharm. Franc. 1955, 13, 359-368.
- 56 - PARIS R., FAUGERAS G. - Application de l'électrophorèse à quelques cas difficiles de séparation d'alcaloïdes : Bases Puriques, Atropine, Brucine, Strychnine, Cocaine, Morphine. Ann.Pharm. Franc. 1958, 16, 305-311.
- 57 - PASCAL P. - Chimie générale - Edit. Masson - Paris 1951, 1, 44.
- 58 - PATTON J., REEDER W. - New Indicator for titration of Calcium with EDTA - An. Chem. 1956, 28 N° 16, 1026-1028.
- 59 - PEETERS H. - New type of bufferfeeding in two dimensional electrophoresis. "Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the Fifth Colloquium, Bruges". Elsevier, Amsterdam. 1957, p. 159-166.
- 60 - PEETERS H., VUYLSTEKE P. - Ionophoresis of the buffersalts during zone and two dimensional electrophoresis. Paper presented at First Intern Congress. Clin. Chem. New-York 1956. J. of Chromatography. 1959, 2, 308.
- 61 - PEETERS H., VUYLSTEKE P., NOE R. - Ionophoretic pattern during zone and two dimensional electrophoresis. Paper presented et second Intern Congress. Clin. Chem. Stockholm 1957. J. of Chromatography. 1959, 2, 308-319.
- 62 - PEETERS H. - Paper electrophoresis. Principles and Techniques. Adv. Clin. Chem. 1959, 2, 91-120.
- 63 - PEETERS H. - Paper electrophoresis. Principles ans Techniques. Adv. Clin. Chem. 1959, 2, 125-132.
- 64 - RINGBOM A. - Complexation Reaction. Abo Akademi - Abo Finland. from Treatise on Analytical chemistry. Part 1, vol 1, 543.

- 65 - ROLOVITCH I., FABRIZIO G., CASSILI L. - Notizie tecnico-analitiche sull'idrossocobalamina. Il Farmeco (Prat). 1962, XVII, 591.
- 66 - RUBIN M. - Symposium of complexing Agents presented at the University of Chicago. 22 feb 1951.
- 67 - SANO I., HARUTOSHI K. - Nachweiss von Suchmitteln im Harn mit Hilfe der Hochspannungs elektrophorese. Klin - Wschr - 1955, 33, 956-958.
- 68 - SAROFF H.A. - An easily assembled continuous electrophoresis apparatus. Nature - 1955, 175, 896.
- 69 - SCHWARZENBACH B. - Organic Complex-forming compounds. Expérientia Suppl N° 5 1956, 162-192.
- 70 - SCHWARZENBACH G., SENN H., ANDEREGG G. - Komplexone XXIX. Ein grosser II Chelateffekt besonderer Art. Helv. Chim. Acta. 1957, 40, 1886.
- 71 - SELDEN G.L., WESPHAL U. - An apparatus for continuous paper electrophoresis. J. Lab. Clin. Med. 1957, 5, 786.
- 72 - SIDWICK N.W. - The covalent link in chemistry. Oxford. University Press. New-York - 1933.
- 73 - STRACT H.V., NIYOGIS K. - A new technique of chromatography and ionophoresis. Clin. Chim. Acta. 1959, 4, 893-900.
- 74 - STRAIN H.H. - Chromatographic systems - Anal - Chem 1951, 23, 25.
- 75 - STRAIN H.H. , SULLIVAN J.C. - Analysis by electromigration and chromatography. Anal. Chem. 1951, 23, 816.
- 76 - STRAIN H.H. - Qualitative séparations by two-way or three-way electrochromatography. Anal. Chem. 1952, 24, 356.
- 77 - SWENSSON H., BRATTSTEN I. - An apparatus for continuous électrophoretic séparation in flowing liquids. Arkiv. Kemi. 1949, 1, 401-411. from Chem. Abstr. 1950, 44, 3334.
- 78 - TISELIUS A. - Electrophoresis : Past, Present and Future. "Protides of the Biological Fluids. Proceedings of the Fifth Colloquium, Bruges". Elsevier, Amsterdam 1957, p. 1-10.
- 79 - TISELIUS A. - The moving boundary method of studying the electrophoresis of proteins. Nova Acta Regiae. Soc. Sci. Upsaliensis. 1930, 7 (4), 1-107.
- 80 - TRONCHET J. - La détermination complexométrique du Calcium serique. Proposition d'une technique de dosage directe. Ann. Biol. Clin. 1958, 16, 459-468.
- 81 - URBAIN G. SENECHAL A. - Introduction à la chimie des complexes. A Hermann Edit. Paris 1913.
- 82 - WERNER A. - Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der organischen Chemie. Friedrich Vieweg it Sohn. Brunswick 4e édit. 1920, 44.

TABLE DES MATIERES

Introduction.

Première partie.

I - Généralités sur l'électrophorèse continue.
Rappel des travaux antérieurs. page 3

II - Aperçus sur la constitution des complexes et
des chélates. page 9

Deuxième partie. Travaux personnels.

I - Adaptation de l'appareil à électrophorèse page 13

II - Etude de l'électrophorèse continue de sels
simples :
1 - Acétate de Cobalt page 19
2 - Sulfate de Cuivre page 21

III - Etude de l'électrophorèse continue d'un
mélange complexe : l'Antimoniotatrate acide
de Potassium. page 24

IV - Etude de l'électrophorèse continue de chélates
de l'acide éthylène diamine tétra-acétique :
1 - chélate de Calcium page 29
2 - chélate de Cuivre page 35

V - Etude de l'électrophorèse continue de complexes
cobaltiques :
1 - la Cyanocobalamine page 43
2 - l'Hydroxocobalamine page 45
3 - le mélange de Cyano et Hydroxocobalamine page 47

VI - Etude de l'électrophorèse continue d'Alcaloïdes :
1 - Atropine-Strychnine page 53
2 - Morphine-Cocaine page 56

VII - Etude de l'électrophorèse continue du mélange
médicamenteux : salicylate de Sodium, Glucose,
Héxaméthylène-tétramine. page 62

Troisième partie.

Discussion. page 71

Conclusions. page 77

Bibliographie. page 79

